

FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN BIOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO [2018-2019]

TÍTULO:

**RELACIÓN ENTRE LA FRAGMENTACIÓN DE HÁBITAT Y LA
ESTRUCTURA TRÓFICA EN ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS**

AUTOR:

ALBA GARRAPISO AMORÓS

TUTOR:

SANTIAGO SOLIVERES CODINA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi tutor Santiago Soliveres por el apoyo que me ha brindado durante los meses que he dedicado a elaborar este trabajo, por guiarme durante todo el proceso y por haberme permitido formar parte de su proyecto RyC-2016-20604.

A Pablo García, Adrián Martínez, Delfina Martínez y Rocío Montes; por su ayuda en el trabajo de campo y en la separación de la fauna.

A Jimmy Morales, por aportar sus conocimientos en la identificación de la fauna del suelo.

A Jordi Acosta, Leti Asensio y José Carlos Cristóbal; por poner a disposición de este trabajo sus conocimientos en la identificación de las plantas vasculares.

A Fran Barrero, José Huesca y Silvia Ivars; por estar siempre dispuestos a ayudar y por su gran apoyo en el laboratorio.

A Estrella Pastor y Aymen Moghli, por su gran ayuda en el trabajo de campo y en los análisis de suelo, por hacer más amenas las jornadas de laboratorio, y por todas las palabras de apoyo.

A Fran Romero, por ser un gran compañero, por haber compartido conmigo el nivel de estrés que conlleva esta experiencia y por ayudarme en todo lo posible.

A Toni Díaz, por haber invertido su tiempo y por ofrecerme consejos de redacción que solo podrían venir de un escritor.

A Noelia Garrapiso, por cuidar de mi inglés como nadie sabe.

A Claudia Mariano, por abrirme la biblioteca sin quejarse siempre que ha sido necesario, por ser una experta buscando sinónimos y por hacerme más llevaderos los días de trabajo.

A Marcos Flores, por haber estado dispuesto a escucharme en todo momento y por todas las palabras de ánimo.

Y, por último y no por ello menos importante, a mi familia, por haberme facilitado siempre el poder estudiar y por haberme apoyado en todo.

Gracias a todos. Habéis hecho que esta etapa sea un poco más feliz.

RESUMEN

La pérdida de biodiversidad es uno de los principales problemas ambientales del mundo. Entre los motivos que la provocan, se encuentran la fragmentación y la degradación de calidad del hábitat, que afectan a gran variedad de taxones. Sin embargo, poco se conoce acerca de cómo influyen estas variables en los grupos tróficos de los organismos del suelo. Por ello, con este estudio se pretende aportar información acerca de la respuesta de distintos grupos tróficos y de la propia estructura trófica a cambios ambientales como el tamaño del parche, la concentración de carbono orgánico en el suelo y la calidad del hábitat. Ésta última fue determinada mediante la salud del parche en base a su afección por la “seca”, una patología provocada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. Para ello, en el carrascal de la Font Roja (Alcoy), se recogieron muestras al azar en zonas de parche y de claro, y en zonas sanas y afectadas por la “seca”. En cada zona se midió el tamaño del parche, la biodiversidad de la fauna del suelo y la salud de la encina; y se recogieron muestras de suelo. Los resultados mostraron que el área del parche no afecta significativamente a la estructura trófica de la fauna del suelo, dominada por detritívoros. Pero sí lo hace la calidad del hábitat, pese a que ésta sólo influya en dos grupos tróficos (micófagos y herbívoros). Además, los grupos tróficos no responden igual a los mismos cambios ambientales. Concretamente, el área no influyó significativamente en ningún grupo en particular, salvo en las plantas vasculares; y el carbono orgánico tuvo efectos significativos tanto para la riqueza como para la abundancia en varios grupos tróficos. Los que se vieron más afectados positivamente fueron los detritívoros y los depredadores. Pero, dado que los efectos de la fragmentación sobre la biodiversidad son retardados y dependientes de la escala, se necesitaría un estudio a largo plazo para ver cómo responde la fauna del suelo a estos cambios ambientales.

Palabras clave: biodiversidad; calidad de hábitat; *Quercus rotundifolia*; Font Roja; *Phytophthora cinnamomi*.

ABSTRACT

Biodiversity loss is one of the main environmental problems in the world. The fragmentation and the degradation of habitat quality are two of the reasons for this loss, because these habitat changes affect a wide variety of taxa. However, the influence of these variables (habitat size and quality) on soil trophic groups is not well understood. This research aims to provide information about the response of different trophic groups and trophic structure to environmental changes like patch size, concentration of organic carbon in the soil and habitat quality. The latter was determined by the health of the patch based on its condition by “oak die-off”, a pathology caused by the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. To accomplish this, samples were collected randomly in patch and cleared areas, and in healthy and affected by “die-off” areas in Font Roja (Alcoy). At each sample, we measured the patch size, the soil fauna biodiversity and the oak health; and we collected soil samples. The results showed that patch area does not significantly affect the trophic structure, which is dominated by detritivores. However, the quality of the habitat does, although it affects only two trophic groups (mycophages and herbivores). In addition, trophic groups do not respond equally to the same environmental changes. Specifically, the area did not significantly influence any particular group, excepting the vascular plants; and soil organic carbon had significant effects for richness and abundance in some trophic groups. The ones that were the most affected positively were the detritivores and the predators. But, since the fragmentation effects on biodiversity are delayed and scale-dependent, a long-term study would be needed to see how soil fauna responds to these environmental changes.

Key words: biodiversity; habitat quality; *Quercus rotundifolia*; Font Roja; *Phytophthora cinnamomi*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
2. ANTECEDENTES	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
3.1 Zona de estudio	5
3.2 Diseño experimental	6
3.3 Análisis estadísticos	9
3.4 Plan de trabajo	10
4. RESULTADOS	11
4.1 Respuesta de distintos grupos tróficos a cambios ambientales	11
4.2 Variación de la estructura trófica con la fragmentación y la calidad del hábitat	20
5. DISCUSIÓN	21
5.1 Los grupos tróficos no responden igual a los mismos cambios ambientales	21
5.2 La estructura trófica varía con la calidad del hábitat	24
6. CONCLUSIONES	25
6.1 Conclusion	27
7. BIBLIOGRAFÍA	29
8. ANEXOS	36

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Situación de El Carrascal de la Font Roja al Suroeste de la Font Roja al Oeste de El Menejador. La zona de trabajo ha sido señalada con un recuadro azul. (Visor cartográfico de la Generalitat)	5
Figura 2. Fotografía de la zona de estudio en detalle	5
Figura 3. Fotografías en las que se muestran los dos tipos de zonas de muestreo: claro (A) y parche (B)	7
Figura 4. Fotografía donde se muestra el método del embudo de Berless-Tullgren. Se puede ver la fuente de luz, los embudos y el recipiente donde cae la fauna con el líquido fijador	8
Figura 5. Representación de la abundancia de los taxones de mesofauna encontrados en toda la zona de estudio, uniendo parches y claros (A); y en detalle las más abundantes (B). La mayoría de los taxones están representados a nivel de familia, pero también encontramos algunos a nivel de género	12
Figura 6. Representación de la abundancia de los taxones de macrofauna encontrados en toda la zona de estudio, uniendo parches y claros (A); y en detalle las más abundantes (B). La mayoría de los taxones están representados a nivel de género	12
Figura 7. Representación del número de especies de cada taxón de mesofauna encontradas en toda la zona de estudio, uniendo parches y claros (A); y en detalle las más abundantes (B). La mayoría de los taxones están representados a nivel de familia, pero también encontramos algunos a nivel de género	13
Figura 8. Representación del número de especies de cada taxón de macrofauna encontradas en toda la zona de estudio, uniendo parches y claros (A); y en detalle las más abundantes (B). La mayoría de los taxones están representados a nivel de género	14
Figura 9. Representación de la abundancia de cada grupo trófico en cada clase de tamaño de parche	15
Figura 10. Representación del número de especies de cada grupo trófico en cada clase de tamaño de parche	15
Figura 11. Se muestra la variación en abundancia de los distintos grupos tróficos en función del área del parche. La abundancia se presenta en forma logarítmica	17

Figura 12. Se muestra la variación de la riqueza de los distintos grupos tróficos en función del área del parche	18
Figura 13. Se muestra la variación de la abundancia de los distintos grupos tróficos en función del porcentaje de carbono orgánico del suelo	19
Figura 14. Se muestra la variación del número de especies de los distintos grupos tróficos en función del porcentaje de carbono orgánico del suelo	19
Figura 15. Se muestra la variación de la estructura trófica, medida mediante el Índice de Shannon, en función del área del parche	20
Figura 16. Fotografía en la que se ven algunas de las muestras analizadas debajo de la campana de extracción de gases mientras se dejaban enfriar. Además, señalado con una flecha blanca, encontramos el dispensador calibrado que se usó para añadir los 20 ml de H ₂ SO ₄	38
Figura 17. Fotografía en la que se observa el color verdoso que toma la muestra antes del viraje. También se ve la bureta y el flexo que se usó como fuente de luz cercana, señalados ambos con una flecha blanca	38
Figura 18. Fotografía en la que se puede ver el color resultante tras el viraje (marrón-rojizo) que pone fin a la valoración	38
Figura 19. Fotografía de una de las placas en las que se midió la absorbancia a 880 nm. En cada pocillo se encuentran 300 µl de cada muestra	41
Figura 20. Esquema del proceso de la determinación manual de la textura del suelo (Tongway y Hindley, 2004)	44
Figura 21. Fotografía de los tubos de los patrones obtenidos ordenados de mayor a menos concentración de p-nitrofenol	47
Figura 22. Fotografía de una de las placas en las que se midió la absorbancia a 440 nm. En cada pocillo se encuentran 300 µl de cada muestra	47
Figura 23. Fotografía de una de las placas en las que se midió la absorbancia a 400 nm. En cada pocillo se encuentran 300 µl de cada muestra	50

Tabla 1. Cronograma organizativo de las tareas llevadas a cabo para la elaboración del trabajo. Cada casilla es el equivalente a 15 días 10

Tabla 2. Tabla resumen de los resultados obtenidos de la abundancia de los grupos tróficos mediante regresiones lineales múltiples sin la interacción entre los predictores. Con un asterisco (*) se han marcado los valores significativos 17

Tabla 3. Tabla resumen de los resultados obtenidos de la riqueza de los grupos tróficos mediante regresiones lineales múltiples sin la interacción entre los predictores. Con un asterisco (*) se han marcado los valores significativos 17

Tabla 4. Clasificación del suelo en función de su textura (Tongway y Hindley, 2004) 44

1. INTRODUCCIÓN

La fragmentación y destrucción del espacio natural está mediada principalmente por cambios en el uso de la tierra debido a actividades humanas como la expansión de cultivos y pastizales o la eliminación de terrenos agrícolas en beneficio de las áreas urbanas (Loh y Wackernagel, 2004). Esto implica el retroceso del territorio disponible para los hábitats silvestres y constituye una de las principales y más frecuentes amenazas a la biodiversidad del planeta (Fahrig, 2003). Actualmente, el 70 % de los bosques del mundo se encuentra a menos de 1 km de un borde (Haddad *et al.*, 2015) y el tamaño de los fragmentos de bosques en los trópicos se está reduciendo rápidamente, siendo la media de 29 ha por fragmento (Brinck *et al.*, 2017).

La fragmentación del hábitat afecta a la biodiversidad a través de múltiples vías. Por ejemplo, una pérdida regional en la cantidad de hábitat genera una reducción del tamaño poblacional, aumentando así el riesgo de que las poblaciones alcancen un umbral por debajo del cual son inviables y, por tanto, se produzcan extinciones locales (Santos y Tellería, 2006). Por otro lado, la fragmentación causa la pérdida no aleatoria de especies clave en el ecosistema, lo que afecta a su funcionamiento debido a la pérdida de rasgos funcionales importantes (Wardle, 2016). También dificulta la dispersión, generando una disminución en la conectividad entre poblaciones que disminuye la resistencia y adaptación del hábitat (Tewksbury *et al.*, 2002; Staddon *et al.*, 2010). Todos estos procesos llevarán al ecosistema a etapas de sucesión más tempranas que conducen a la homogeneización biótica, a la simplificación de la complejidad, a la disminución de la diversificación y a una mayor competencia intra e interespecífica (Bregman *et al.*, 2015). Así pues, las nuevas comunidades resultantes estarán dominadas por especies exigentes de luz y tolerantes a la sequía (Lôbo *et al.*, 2011); y especies exóticas y de rápido crecimiento que tienden a deteriorar en poco tiempo la arquitectura forestal y el almacenamiento de carbono (Laurance *et al.*, 2006). Estas alteraciones bióticas afectarán de un modo negativo al funcionamiento del ecosistema (Liu *et al.*, 2018).

Si bien la fragmentación es importante e influye en la supervivencia de las especies, también lo hacen los requerimientos propios de estas y la calidad del fragmento en sí, pues las especies no se distribuyen homogéneamente y de manera continua a lo largo de su área de distribución, sino que lo hacen de forma agregada con variaciones en función de los recursos y de las características del medio (climáticas, edafológicas, interactivas entre organismos, acción antrópica, etc.) (Ramírez, 2004). Además, debido a la heterogeneidad del paisaje, éste no presenta sus recursos de igual forma en toda el área, por lo que la desaparición de un recurso

en un fragmento se traduce en una extinción local de las especies más especializadas (Herrera, 2011). Dado que en este estudio trabajaremos en un encinar de *Quercus rotundifolia*, para la determinación de la calidad del parche nos centraremos en la salud del fragmento en base a su afección por la “seca”, debido a que ésta se ha convertido en un problema fitosanitario muy extendido y de gran importancia por su agresividad y altas tasas de mortalidad que provoca en muchos tipos de bosques, entre los que se encuentran los de *Quercus* (Tejeda y Lavado, 2018), e influye directamente en la calidad del parche forestal. La “seca” no es una enfermedad en sí misma, sino la consecuencia de múltiples factores (climáticos, edáficos, biológicos y humanos), entre los que se encuentra el organismo patógeno *Phytophthora cinnamomi* (De Vita *et al.*, 2010), cuya actividad provoca el decaimiento y deterioro gradual del estado fisiológico de las encinas con síntomas similares a los de la sequía, culminando generalmente con la muerte del árbol (CICYTEX, 2014). En el caso de este estudio, las encinas seguían vivas, pero habían perdido todas sus hojas, que provoca un gran aporte de materia orgánica al suelo. Este aporte, en principio, podría ser beneficioso para la fauna del suelo (más materia orgánica para descomponer), pero podría acabar afectándola negativamente (más luz y menor humedad edáfica, condiciones que dificultan el desarrollo de este tipo de fauna).

Por otro lado, la pérdida de biodiversidad fruto de la fragmentación y degradación de calidad del hábitat afecta a gran variedad de taxones (Liu *et al.*, 2018). El modo y grado de alteración cambia a lo largo de los niveles tróficos, con consecuencias especialmente negativas en los depredadores, pero menos en los organismos autótrofos o herbívoros (Poisot *et al.*, 2013). En este estudio nos centraremos en la fauna del suelo, ya que es la más abundante de cualquier ecosistema (Bardgett, 2005). Igualmente, son capaces de responder de manera pronunciada a variaciones en las condiciones del suelo (pH y conductividad) y a su contenido en nutrientes, como es el caso de la variación en la proporción bacterias:hongos al alterarse la de C:N (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) o el de la disminución de colémbolos y ácaros con el aumento de la temperatura del suelo (Jiménez-Chacón *et al.*, 2018). Por tanto, las respuestas de distintos grupos tróficos a la fragmentación pueden variar de forma muy contrastada lo que puede afectar no sólo a la biodiversidad, sino a la estructura trófica de las comunidades de dichos parches.

Pese a la importancia de lo explicado en los párrafos anteriores para la preservación de la calidad de los hábitats, ha habido relativamente pocos estudios empíricos que evalúen específicamente los efectos de la fragmentación del paisaje sobre la biodiversidad y la estructura trófica (Cagnolo y Valladares, 2011). Sin embargo, en los últimos años, los investigadores han comenzado a paliar este vacío de información estudiando los impactos de este fenómeno en

distintas propiedades del ecosistema como por ejemplo, el almacenamiento de carbono (Chaplin-Kramer *et al.* 2015; Pütz *et al.*, 2014).

Con este trabajo se pretende aportar nueva información acerca del efecto de la fragmentación y calidad de hábitat sobre la diversidad vegetal y de fauna del suelo, y su estructura trófica en las comunidades que encontramos en el encinar mediterráneo.

1.1 OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado consta de los siguientes objetivos:

1. Comprobar si distintos grupos tróficos responden igual a los mismos cambios ambientales.
2. Determinar si la fragmentación y la calidad del hábitat afectan a la estructura trófica en ecosistemas mediterráneos.

Tras todo lo mencionado anteriormente, podemos esperar que la respuesta de cada grupo trófico ante los mismos cambios ambientales sea diferente debido a las características, requerimientos y resistencia de cada uno. De este modo, se espera que en zonas afectadas por la “seca” o que sean más pequeñas a causa de la fragmentación, los depredadores y detritívoros se vean más afectados que los herbívoros y las plantas vasculares; y que tanto la fragmentación como la calidad del hábitat influyan en la determinación de la estructura trófica del ecosistema, haciéndola más simple y homogénea en cuanto a composición de especies, a medida que aumenta la fragmentación y disminuye la calidad del hábitat.

2. ANTECEDENTES

En este trabajo nos centraremos en el estudio de la fauna del suelo por su importancia en el reciclado de nutrientes, su gran diversidad y su desconocida respuesta a la fragmentación y calidad del hábitat en ámbitos mediterráneos. Hacemos especial hincapié en los grupos tróficos para tener así una representación de la estructura trófica del ecosistema mediterráneo y, más concretamente, del encinar de la Font Roja, Alcoy. Pese a ser un tema de interés para la ecología,

los estudios que comparan los efectos generales de los cambios ambientales en múltiples niveles tróficos a la vez son escasos. La mayoría de ellos, hablan de un solo grupo trófico o incluso de una única familia de fauna del suelo. Particularmente, para esta zona de estudio, encontramos algunos centrados en los coleópteros, como el de Viñolas (2017) acerca de la Familia *Ptinidae*, el de Cartagena y Viñolas (2005) sobre la Familia *Scaraboidea* o el de Peris-Felipo *et al.* (2010) y el de Peris-Felipo *et al.* (2011) que hablan de la Familia *Cerambycidae*; otros hablan de los himenópteros como el de Hernández-Cuba *et al.* (2008) sobre la Familia *Formicidae* y el de Mazón *et al.* (2009) acerca de la Familia *Ichneumonidae*; también encontramos otros estudios que tratan sobre algunas familias de dípteros, como el de Velásquez *et al.* (2015) sobre *Calliphoridae* y *Sarcophagidae*, el de Bernués (2013) sobre *Culidicae* o el de Ricarte y Marcos-García (2017) acerca de *Syrphidae*; y otros estudios como el de Galván *et al.* (2012), acerca de la Familia *Astigmata* de los ácaros. Estos estudios no estudian simultáneamente la fragmentación y calidad del hábitat, pero, aun así, muestran que no todos los grupos responden igual a los diferentes cambios ambientales. Además, todos ellos obtienen resultados que tratan únicamente de una familia, sin relacionarla con la fauna de su alrededor ni tener en cuenta las relaciones tróficas. Esto que aumenta el interés de estudiar varios grupos tróficos simultáneamente.

No obstante, también hay estudios, aunque pocos, que hablan sobre la respuesta de varios grupos tróficos a cambios en el hábitat. En concreto, hablaremos del estudio de Jiménez-Chacón (2018) que, además, está relacionado con la patología que hemos comentado, la “seca”. Este estudio se llevó a cabo en el Parque Natural de los Alcornocales, al sur de España. Este parque contiene los bosques de alcornoques (*Quercus suber*) mejor conservados de Europa, aunque actualmente se encuentran en declive debido a la invasión del patógeno *Phytophthora cinnamomi*. Los resultados de este estudio muestran la gran influencia que ejerce la calidad del parche en la abundancia de la fauna del suelo a escalas locales, y sugieren que el patógeno se integra en las relaciones tróficas del hábitat al ser capaz de cambiar la composición biótica y abiótica a nivel local y, por tanto, la estructura del bosque. En este estudio, además, comprobamos que la fauna del suelo no se puede abordar como un grupo generalista con diferentes taxones dentro, sino que, para conocer realmente su comportamiento, se ha de estudiar como grupos tróficos claramente separados y especializados para diferentes microentornos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio (*Fig. 1 y 2*), que ocupa una superficie de unas 10 ha, con unas coordenadas 38°39'25''N 0°33'12''W en el vértice noroeste, se trata de un encinar abierto. Pertenece al Parque Natural del Carrascal de la Font Roja y se encuentra situada al suroeste de la población de Alcoy, municipio de la provincia de Alicante, asentada sobre la zona de solana de la Sierra del Menejador.

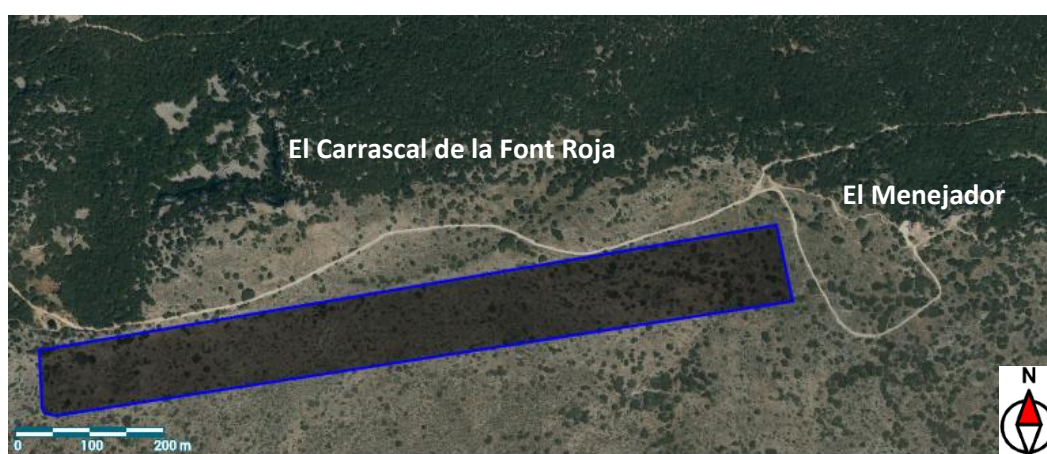


Figura 1. Situación de El Carrascal de la Font Roja al Oeste de El Menejador. La zona de trabajo ha sido señalada con un recuadro azul. (*Visor cartogràfic de la Generalitat*)



Figura 2. Fotografía de la zona de estudio en detalle.

Este encinar sublitoral forma parte de las estribaciones prebéticas localizadas al norte de la cordillera Bética (Gil *et al.*, 2000). Mayormente, la sierra se trata de un territorio con sustrato

calcáreo del Terciario con importante actividad cárstica, sobre los que aparecen gravas y arcillas del Cuaternario con yesos diseminados (Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural, 2015). El suelo presenta zonas con afloramientos de roca madre, pero en las zonas de muestreo usadas, se observó gran cantidad de materia orgánica en descomposición.

El clima de la zona es de tipo mesomediterráneo seco. Su temperatura media anual ronda los 11 °C, y las precipitaciones medias son de 400 mm anuales (Visor Cartogràfic de la Generalitat). Todo ello favorece el desarrollo del bosque mixto de encinas (*Quercus rotundifolia*), y robles (*Quercus faginea*) con arces (*Acer opalus subsp. granatense*), fresnos (*Fraxinus ornus*) y mostajos (*Sorbus aria*), rodeado por especies espinosas como el cerezo de pastor (*Crataegus monogyna*), endrino (*Prunus spinosa*) y rosales (*Rosa sp.*) (Parcs Naturals de la Comunitat Valenciana).

En cuanto a la fauna, nos centraremos principalmente en la que evaluamos en este estudio, que se trata de los taxones pertenecientes a la macrofauna y mesofauna del suelo. Éstas se diferencian en el tamaño de los organismos. De este modo, el tamaño de la mesofauna es de 0.1 - 2 mm, y el de la macrofauna es superior a los 2 mm (Bardgett, 2005). Las agruparemos en grupos tróficos. Uno de ellos es el grupo de los detritívoros, el cual es el más abundante, al que pertenecen los ácaros (Familia *Oribatida*), los colémbolos (Familia *Isotomidae*) y los coleópteros (Familias *Carabidae* y *Staphylinidae*); otros son omnívoros, como es el caso de la Familia *Formicidae* de los himenópteros; y otros, como la Familia *Xyelidae* también de los himenópteros, a los herbívoros.

Por último, en este paraje todavía se pueden observar huellas de actividades que el hombre desarrolló aprovechando los recursos naturales y que fomentan la fragmentación del hábitat y la pérdida de biodiversidad. Entre estas prácticas encontramos las carboneras para la producción de carbón vegetal, los antiguos hornos de leña, la explotación de las tierras cultivadas sobre las faldas de la montaña, construcciones como las Masías, establos y corrales, y pozos de nieve (Oficina de Turismo de Alcoy).

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

- **TRABAJO DE CAMPO**

Las muestras recogidas fueron tomadas al azar en parches de distintas dimensiones. Fueron divididas en dos clases (Fig. 3): clase claro, donde las variables de estudio y las muestras se recogieron en zonas donde la vegetación dominante es dispersa y está constituida principalmente por pequeños matorrales; y clase parche, en las que se recolectaron debajo de una encina. Cada una de ellas simula un “parche de bosque” con distintos tamaños y niveles de calidad (encinas afectadas por la “seca” o no). En total, se tomaron 43 mediciones de clase parche y 5 de clase claro.

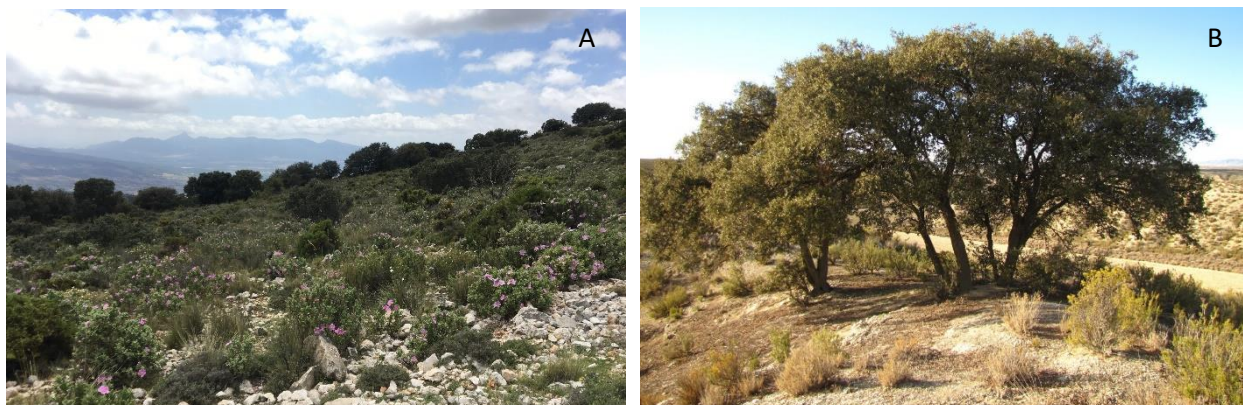


Figura 3. Fotografías en las que se muestran los dos tipos de zonas de muestreo: claro (A) y parche (B).

En campo, se recogieron muestras de suelo para analizarlas en el laboratorio y se midieron las siguientes variables: el tamaño del parche, mediante el área de la elipse que formaba la copa de la encina; la salud de la encina de cada parche mediante su afección por la “seca”; y la biodiversidad de la fauna del suelo (mesofauna y macrofauna), con el uso del método del embudo de Berlese-Tullgren (Fig. 4). El método consta de un pequeño tamiz sobre un embudo en el que se coloca la hojarasca y el suelo tomado en campo, que pertenecen a los primeros centímetros y que contienen la fauna a recolectar. En nuestro caso, se tomaron dos muestras de 25 x 25 cm bajo cada parche, en las que se recolectó toda la hojarasca y los primeros dos centímetros de suelo. Estas muestras se mezclaron en una muestra compuesta, que se colocó en los embudos. Sobre el embudo, se sitúa una fuente de luz que va calentando y secando la muestra. De este modo, la fauna al evitar esas condiciones, se va alejando de la superficie y se concentra en la parte inferior del embudo. Finalmente, la fauna acaba cayendo a un recipiente que contiene alcohol al 70 % como fijador y conservante. Después de tres días en el embudo, las muestras se colocaron en bandejas para recolectar con pinzas la fauna que seguía allí, principalmente macrofauna.



Figura 4. Fotografía donde se muestra el método del embudo Berleses-Tullgren. Se puede ver la fuente de luz, los embudos y el recipiente donde cae la fauna con el líquido fijador.

• TRABAJO DE LABORATORIO

El trabajo de laboratorio consistió en la realización de distintos tipos de análisis de suelos (Anexo 1). A continuación, hablaremos sólo de tres de los análisis, ya que los resultados obtenidos de ellos son los que hicimos servir para la realización de los análisis estadísticos que se comentan abajo.

a) Tamizar.

El tamizado nos permitió homogeneizar el material recogido en campo y separar la fracción biológicamente activa del suelo ($> 2 \text{ mm}$), que es la que se utilizó en el resto de análisis.

El tamizado se trata de un método mecánico que consiste en separar sólidos de diferentes tamaños, reteniendo las partículas de mayor tamaño que el poro del tamiz y dejando pasar las de menor diámetro (Anexo 1).

b) Análisis de la humedad del suelo.

La humedad es una característica importante de los suelos, pues está relacionada con la respiración del suelo y con el flujo de CO_2 (Davidson *et al.*, 2000). En este análisis en particular se llevó a cabo para conocer el valor de la humedad de nuestros suelos y, de este modo, tenerla en cuenta a la hora de realizar los cálculos en el resto de análisis (contenido de carbono / gramo de suelo), ya que éstos se calculan mediante el peso seco.

Para el cálculo de la humedad del suelo se usó el método gravimétrico, que consiste en pesar una muestra de suelo antes y después del secado. Tras esto, se obtiene el contenido de agua del suelo expresado en porcentaje de humedad (Anexo 1).

c) Cuantificación del contenido en carbono del suelo.

Este análisis se realizó por la importancia que tiene el carbono orgánico en el resto de propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo. Entre ellas encontramos que cuanto mayor es el porcentaje de carbono orgánico del suelo, mayor son los valores de pH, capacidad de intercambio catiónico, agregación de las partículas, porosidad, retención de agua y actividad biológica de los organismos (Martínez *et al.*, 2008).

Esta cuantificación en las muestras de suelo se realizó mediante una variación del protocolo del método Walkley-Black (Walkley y Black, 1931), que se basa en la capacidad oxidante del cromo. En él, se mide cuánto carbono de la muestra queda sin reaccionar al final del método, es decir, cuánto carbono no es oxidado a CO₂ en base a cuánto cromo reducido quede al final de la reacción (Anexo 1).

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tras la obtención de los datos medibles en el laboratorio y en el campo, éstos se pasaron al ordenador. Se usó Excel para el manejo y orden de los datos, y se crearon tablas que permitieran su posterior análisis mediante el software estadístico R y la creación de las figuras en el programa Sigmaplot.

Los análisis que se llevaron a cabo para responder al primer objetivo y, por tanto, poder comprobar si distintos grupos tróficos responden de igual forma a los mismos cambios ambientales, fueron diagramas de barras y regresiones lineales múltiples. En primer lugar, se usaron diagramas de barras para representar cómo varía la abundancia y riqueza tanto de las especies como de los grupos tróficos en función del área del parche. Para ello, se dividieron de los datos de área del parche en las siguientes clases de tamaño: claro, pequeño, mediano y grande; con 14 muestras balanceadas de cada clase, excepto el claro, que presentó 5. A continuación, previamente al análisis estadístico, se comprobó si se cumplían las asunciones en la regresión múltiple (linealidad de los datos, independencia de las variables, homocedasticidad y normalidad de los residuos) y, en caso de que no fuera así, se modificaron los datos para que se cumplieran. Tras esto, se realizaron regresiones lineales múltiples en R con el número de especies u organismos de cada grupo trófico como variables de respuesta, y con el área del parche, su salud y la interacción entre ambos para ver si los predictores las definen y en qué grado, o al contrario, no tienen relación con ellas. Como los organismos del suelo dependen en

gran medida del pH y contenido en carbono orgánico del suelo, estas dos variables se utilizaron como predictores alternativos en otra serie de regresiones múltiples (una por grupo trófico). El análisis se realizó con datos continuos para el área del parche y con los grupos tróficos que presentaban más de 50 individuos. En este caso fueron: plantas vasculares, depredadores, detritívoros, herbívoros, micófagos, parásitos y omnívoros. Pero dado que analizamos la estructura trófica, se prescindió de los omnívoros ya que, debido a su gran variedad de alimentación, el resultado no sería fácil de interpretar. Finalmente, los datos usados para el análisis se representaron gráficamente mediante Sigmaplot.

Para responder al segundo objetivo y determinar si la fragmentación y calidad del hábitat afectan a la estructura trófica, se realizaron regresiones lineales múltiples en R, comprobando previamente que se cumplieran las asunciones en los datos. Para ello, se usó el Índice de Shannon como indicador de la equitatividad de la estructura trófica. Por tanto, las variables de respuesta usadas fueron la estructura trófica calculada tanto con abundancia como con la riqueza de especies; y los predictores fueron el tamaño y el área del parche que, en este caso, también fueron datos continuos. En cuanto a los grupos tróficos utilizados, éstos fueron idénticos a los del primer objetivo por la misma razón. El análisis se realizó para comprobar cómo de equitativa, en cuanto a abundancia y riqueza de especies, es la estructura trófica en función del área y calidad del parche. Tras todo ello, se hicieron servir las anteriores figuras comentadas del primer objetivo y se crearon unas nuevas en Sigmaplot para la representación gráfica de estos datos.

3.4 PLAN DE TRABAJO

Tabla 1. Cronograma organizativo de las tareas llevadas a cabo para la elaboración del trabajo. Cada casilla es el equivalente a 15 días.

TAREAS	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
Revisión bibliográfica						
Análisis de suelo						
Redacción						
Estadística y resultados						
Discusión y conclusiones						
Revisión						
Entrega						
Defensa oral						

El plan de trabajo comenzó con la elaboración de un cronograma (Tabla 1) que tenía por objetivo establecer unas pautas de tiempo, prioridad y orden respecto a las diferentes tareas a

realizar requeridas por el Trabajo de Fin de Grado. Una vez establecido el cronograma, se procedió por orden a la realización de cada una de las tareas tal como se muestra en la Tabla 1.

En lo referente al trabajo de campo, en cada parche se tomaron 4 muestras y medidas de cada variable de estudio, excepto en el caso de las medidas de biodiversidad, que se tomaron una única vez por parche. Esto nos dejó con un total de 192 muestras de suelo que posteriormente se analizaron en el laboratorio. De ellas, se hizo una media por parche de los valores obtenidos en cada análisis para poder trabajar a ese nivel, el mismo que el de los datos de biodiversidad, con 48 muestras.

Pese a que todas las muestras y variables fueron recogidas y medidas previamente al inicio de este estudio, participé activamente en su análisis en el laboratorio, me he familiarizado con las distintas metodologías, y he realizado todos los análisis, figuras y texto que se presenta aquí.

Una vez se tuvieron las muestras recogidas del campo, se dejaron secar al aire. Tras esto, en el laboratorio se procedió a realizar los análisis de laboratorio. Estas jornadas de laboratorio resultaron enriquecedoras, ya que pude aprender de primera mano a realizar todos los análisis anteriormente mencionados y descritos con detalle en el Anexo 1. Además de tener la oportunidad de aplicar los conocimientos teóricos adquiridos en diversas asignaturas del grado como son Edafología, Modelización de Ecosistemas y Biología de la Conservación, entre otras; completando así mi formación académica. También aprendí cómo se trabaja realmente en un laboratorio y qué orden y rutinas se siguen para el análisis de una cantidad tan grande de muestras que nunca antes había manejado, ya que todos los análisis se realizaron en las 192 muestras de suelo, excepto en los que se especifica otro dato.

4. RESULTADOS

4.1 Respuesta de distintos grupos tróficos a cambios ambientales

Se presentan los resultados de abundancia y riqueza para cada grupo de fauna del suelo. En las figuras A, debido al espacio limitado, sólo aparecen la mitad de nombres de los grupos. Por ello usamos las figuras B, para poder mostrar todos los grupos de fauna del suelo más abundantes.

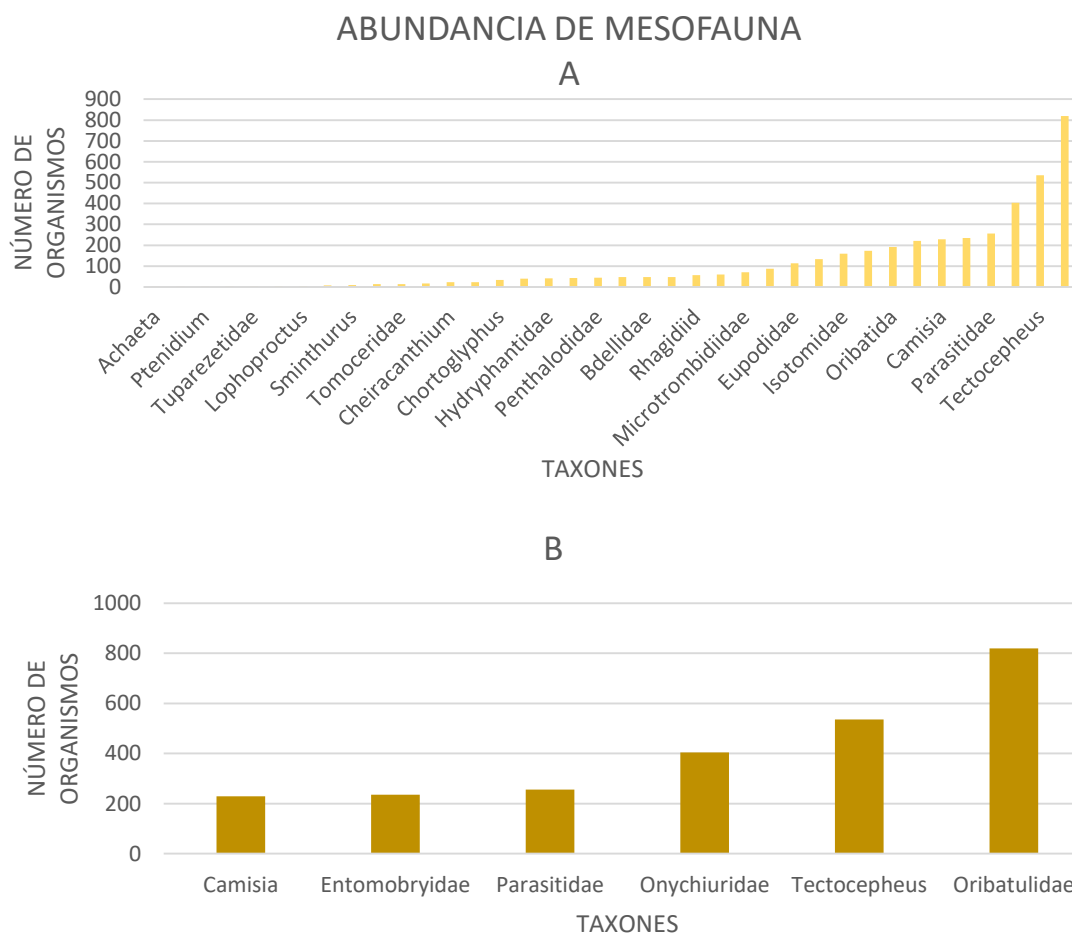
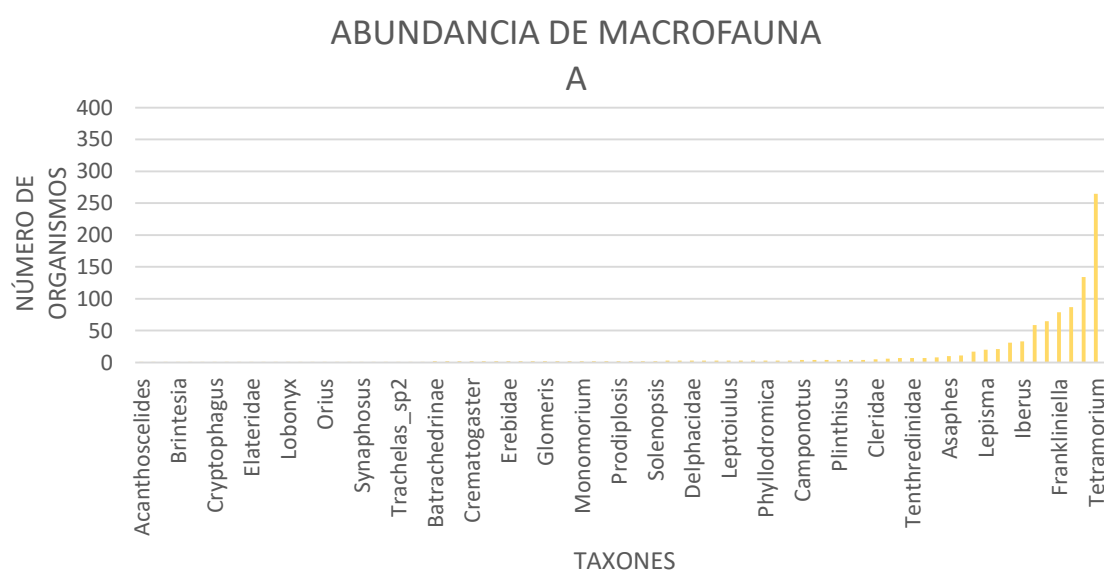


Figura 5. Representación de la abundancia de los taxones de mesofauna encontrados en toda zona de estudio, uniendo parches y claros (A); y en detalle los más abundantes (B). La mayoría de los taxones están representados a nivel de familia, pero también encontramos algunos a nivel de género.



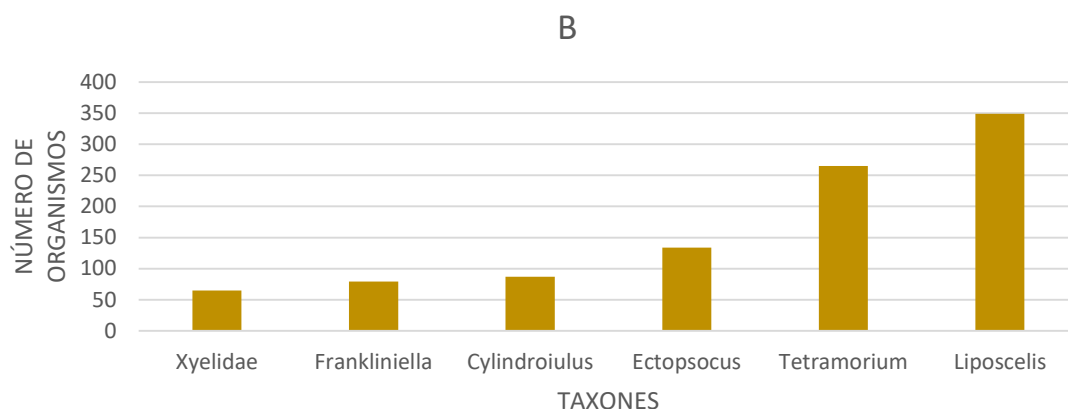


Figura 6. Representación de la abundancia de los taxones de macrofauna encontrados en toda zona de estudio, uniendo parches y claros (A); y en detalle los más abundantes (B). La mayoría de taxones están representados a nivel de género.

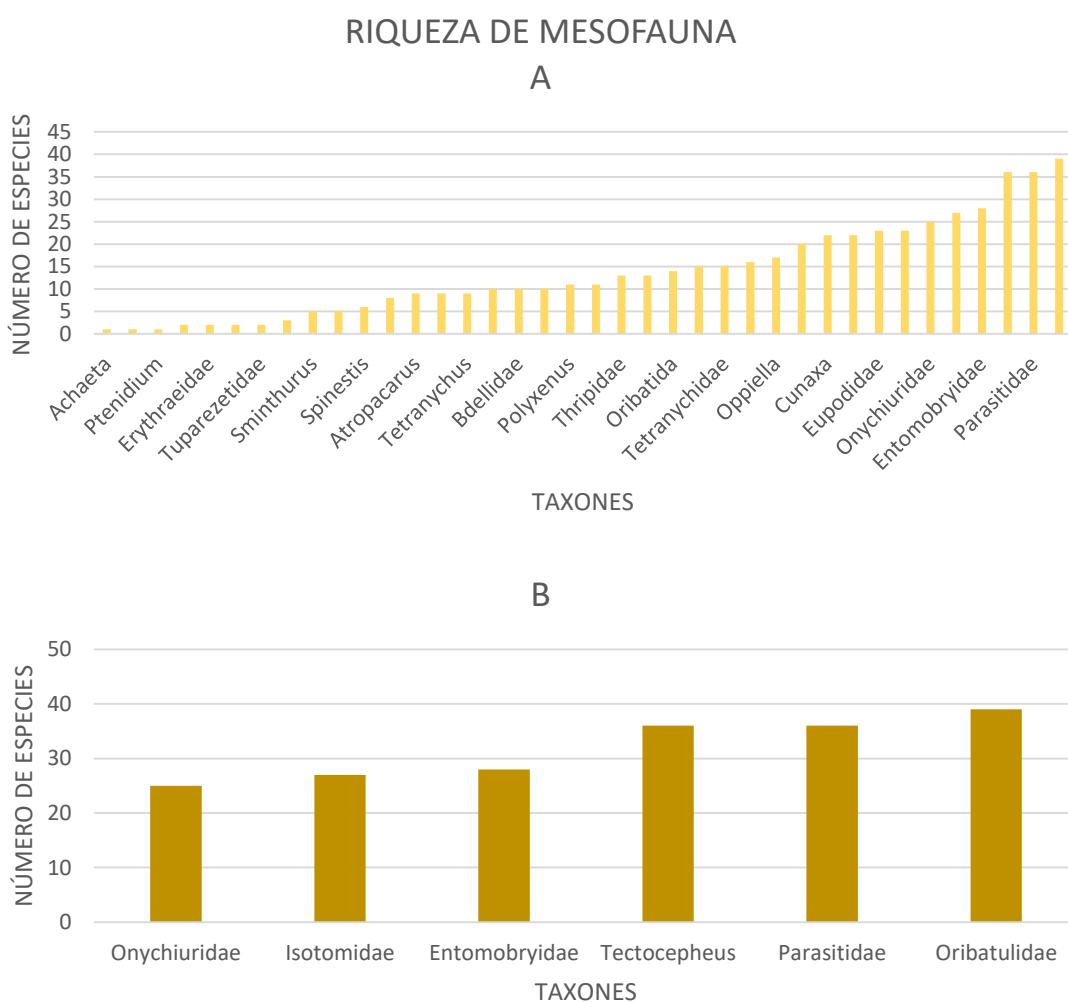


Figura 7. Representación del número de especies de cada taxón de mesofauna encontradas en toda zona de estudio, uniendo parches y claros (A); y en detalle los más abundantes (B). La mayoría de taxones están representados a nivel de familia, pero también encontramos algunos a nivel de género.

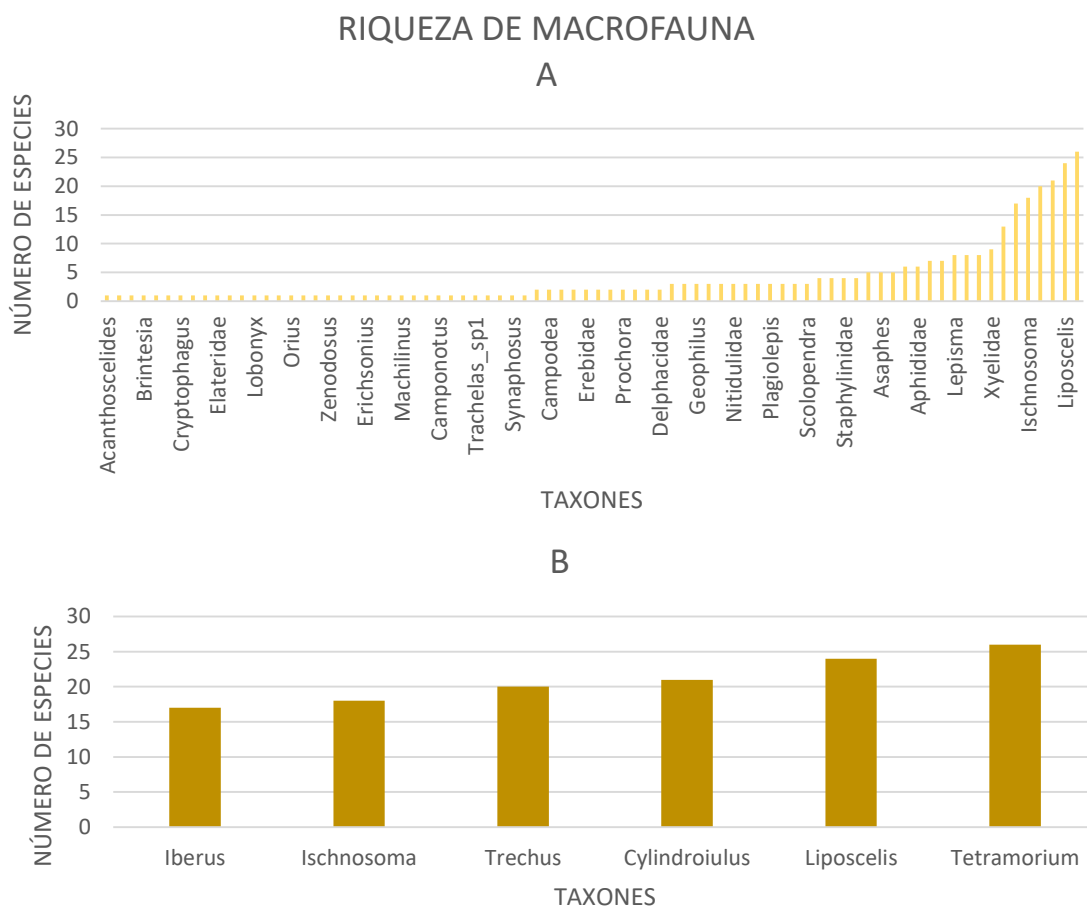


Figura 8. Representación del número de especies de cada taxón de macrofauna encontradas en toda zona de estudio, uniendo parches y claros (A); y en detalle los más abundantes (B). La mayoría de taxones están representados a nivel de género.

En general, se encontraron muchas más especies e individuos de mesofauna que de macrofauna. Los grupos más abundantes y diversos coincidían, pese a variar sus posiciones. Estos puestos fueron ocupados principalmente por ácaros (*Tectocepheus*, *Oribatulidae* y *Camisia*) y colémbolos (*Onychiuridae*, *Entomobryidae* e *Isotomidae*), todos ellos detritívoros. Pero en cuanto a la macrofauna, se vio que los grupos que dominaban en riqueza no eran los mismos que los que lo hacían en abundancia. De ellos cabe destacar los psocópteros (*Ectopsocus* y *Liposcelis*) y los diplópodos (*Cylindroiulus*), ambos grupos también detritívoros.

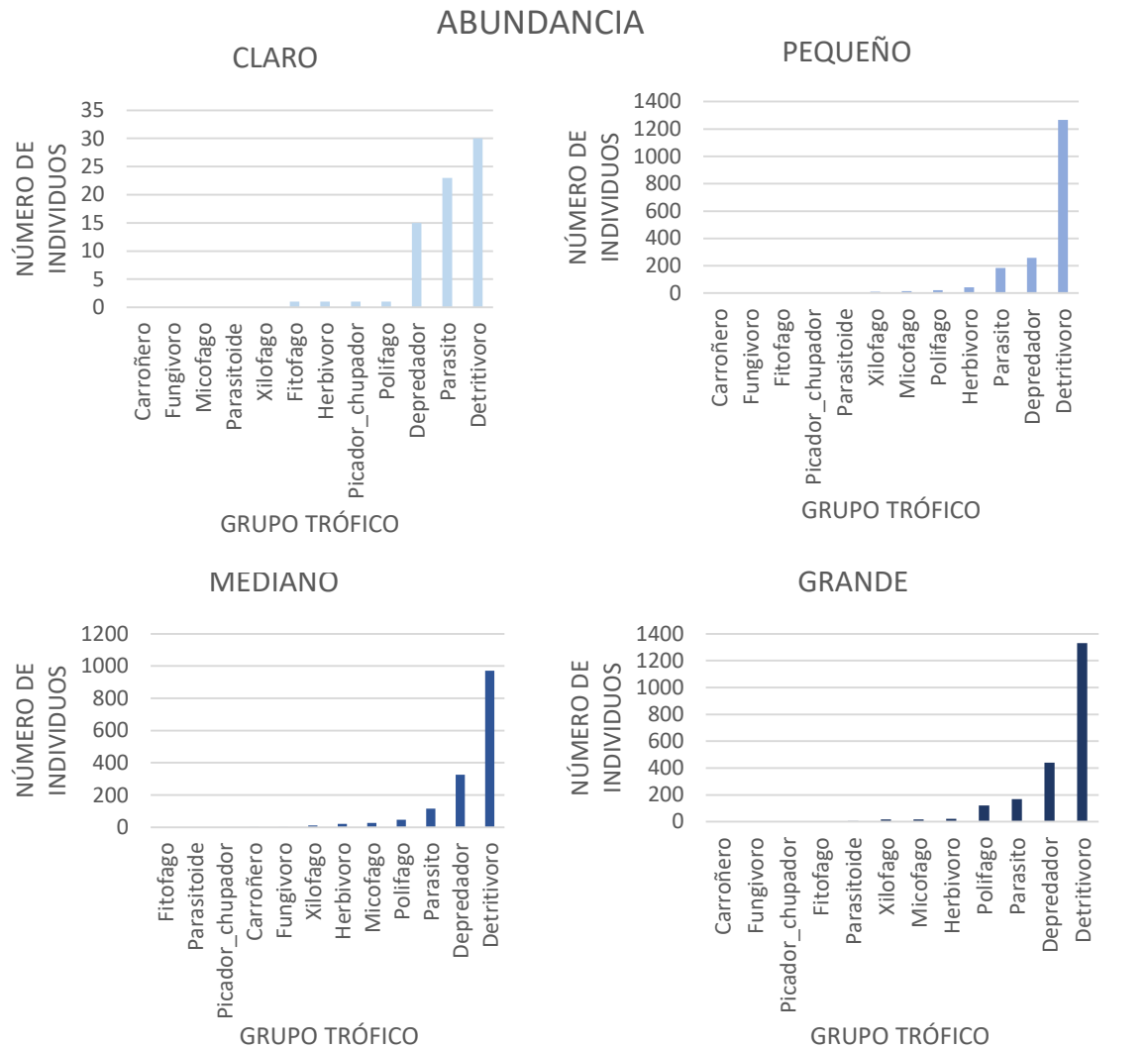
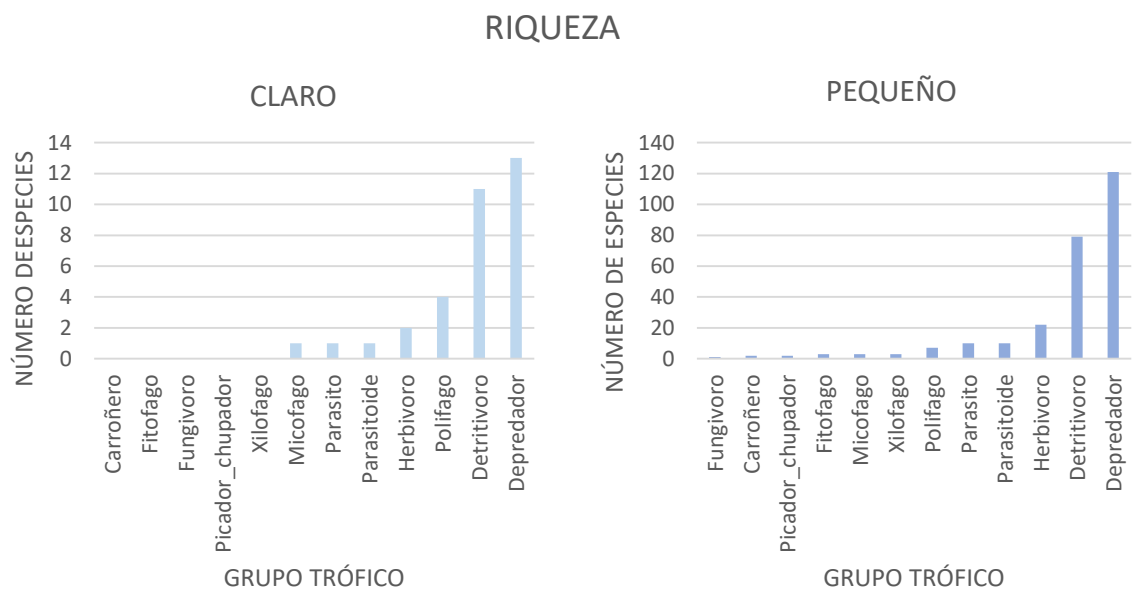


Figura 9. Representación de la abundancia de cada grupo trófico en cada clase de tamaño de parche.



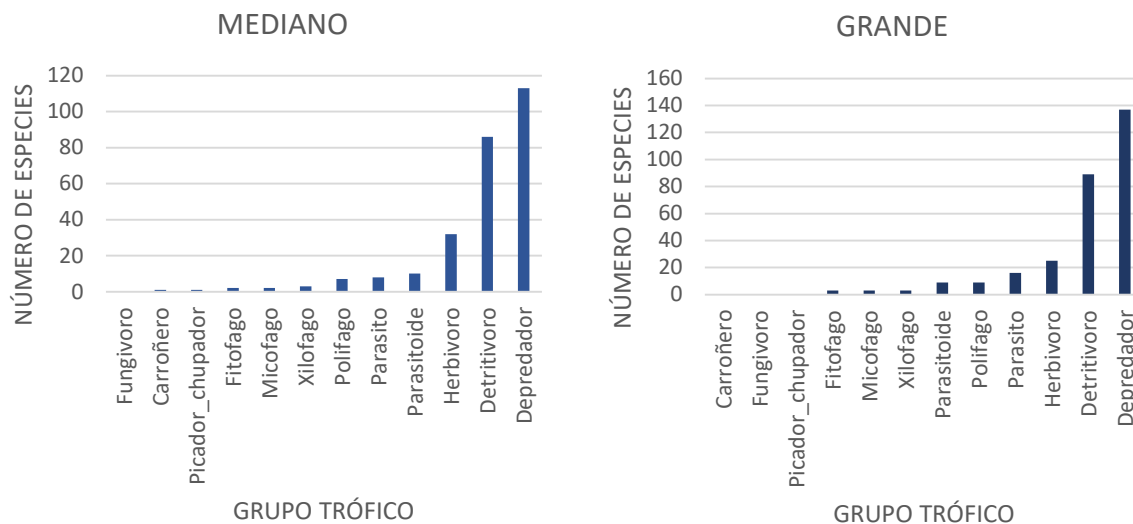


Figura 10. Representación del número de especies de cada grupo trófico en cada clase de tamaño de parche.

No encontramos apenas diferencias en los grupos tróficos más abundantes debido al tamaño de parche, siendo en general más abundantes y diversos los detritívoros y depredadores. Pese a que exista una mayor riqueza de depredadores, los detritívoros fueron más abundantes en cualquier tamaño de parche.

Entre la abundancia y la riqueza se encontraron diferencias. En la abundancia (Fig. 9), a parte de los grupos tróficos mencionados, también aparecieron con gran peso los parásitos, que en el claro fue el segundo grupo más abundante, y para el resto de tamaños, el tercero. En cambio, en la riqueza (Fig. 10) el grupo que apareció con más asiduidad en los parches después de depredadores y detritívoros, fueron los polífagos para el claro y los herbívoros para los demás tamaños.

La interacción entre los predictores tamaño y calidad del parche no fue significativa en ningún caso, por lo que se eliminó de los análisis para obtener un modelo más simple y parsimonioso (Tablas 2 y 3). En las siguientes tablas no se muestran los resultados del pH debido a que comprobamos que éste no tenía relación alguna con la abundancia y riqueza de los grupos tróficos, por lo que no fue significativo para ninguno de los grupos.

Tabla 2. Tabla resumen de los resultados obtenidos de la abundancia de los grupos tróficos mediante regresiones lineales múltiples sin la interacción entre los predictores. Con un asterisco (*) se han marcado los valores significativos.

lm (formula = GRUPO TROFICO ~ AREA + ESTADO + CARBONO ORGÁNICO)												
	PLANTAS VASCULARES		DEPREDADORES		DETRITÍVOROS		HERBÍVOROS		MICÓFACOS		PARÁSITOS	
	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor
(Intercept)	14.720	<2e-16	6.580	8.13e-08	7.055	1.8e-08	0.373	0.711	1.340	0.188	3.927	0.001
AREA	-2.286	0.028 *	-0.256	0.799	0.643	0.524	0.649	0.520	-0.425	0.673	0.698	0.489
ESTADOsana	-1.431	0.160	0.440	0.662	1.131	0.265	2.374	0.023 *	2.458	0.019 *	1.373	0.178
Adjusted R-squared	0.088		-0.042		-0.015		0.081		0.114		0.001	
CARBONO			2.492	0.017 *	2.950	0.005 *	1.302	0.200	0.372	0.712	2.345	0.024 *
Adjusted R-squared			0.100		0.164		0.077		0.076		0.128	

Tabla 3. Tabla resumen de los resultados obtenidos de la riqueza de los grupos tróficos mediante regresiones lineales múltiples sin la interacción entre los predictores. Con un asterisco (*) se han marcado los valores significativos.

lm (formula = GRUPO TROFICO ~ AREA + ESTADO + CARBONO ORGÁNICO)												
	PLANTAS VASCULARES		DEPREDADORES		DETRITÍVOROS		HERBÍVOROS		MICÓFACOS		PARÁSITOS	
	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor	t-valor	p-valor
(Intercept)	10.618	3.33e-13	4.319	0.001	5.995	5.26e-07	3.014	0.004	1.290	0.205	1.516	0.137
AREA	3.545	0.001 *	0.168	0.867	0.059	0.954	-0.065	0.948	-0.649	0.520	0.441	0.662
ESTADOsana	-1.009	0.319	1.734	0.091	0.696	0.491	0.783	0.438	1.048	0.301	1.017	0.315
Adjusted R-squared	0.252		0.026		-0.038		-0.033		0.001		-0.023	
CARBONO			1.938	0.059 *	2.892	0.006 *	3.949	0.001 *	0.751	0.457	1.176	0.247
Adjusted R-squared			0.111		0.145		0.262		0.004		0.007	

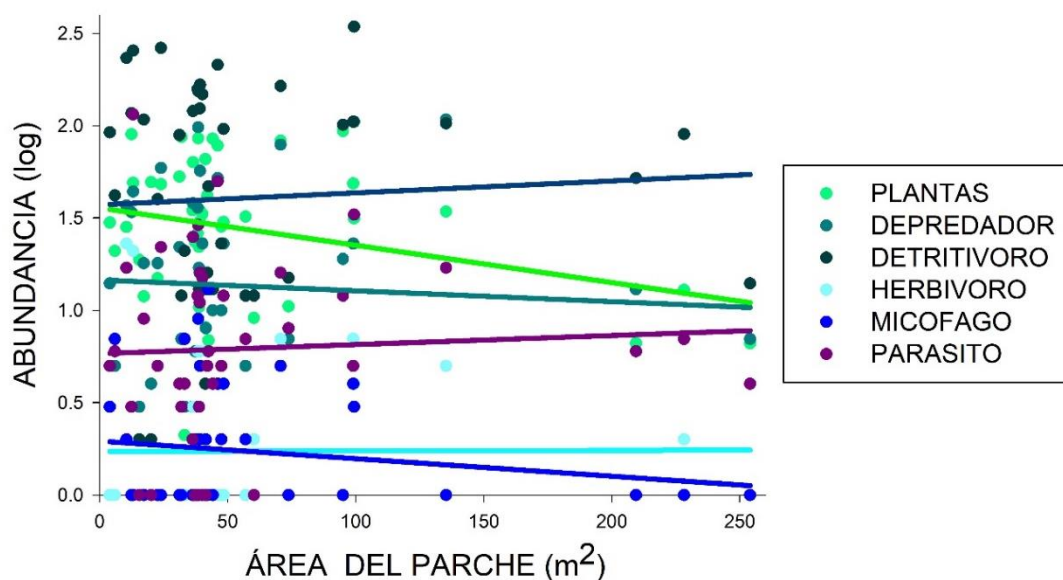


Figura 11. Se muestra la variación en abundancia de los distintos grupos tróficos en función del área del parche. La abundancia se presenta en forma logarítmica.

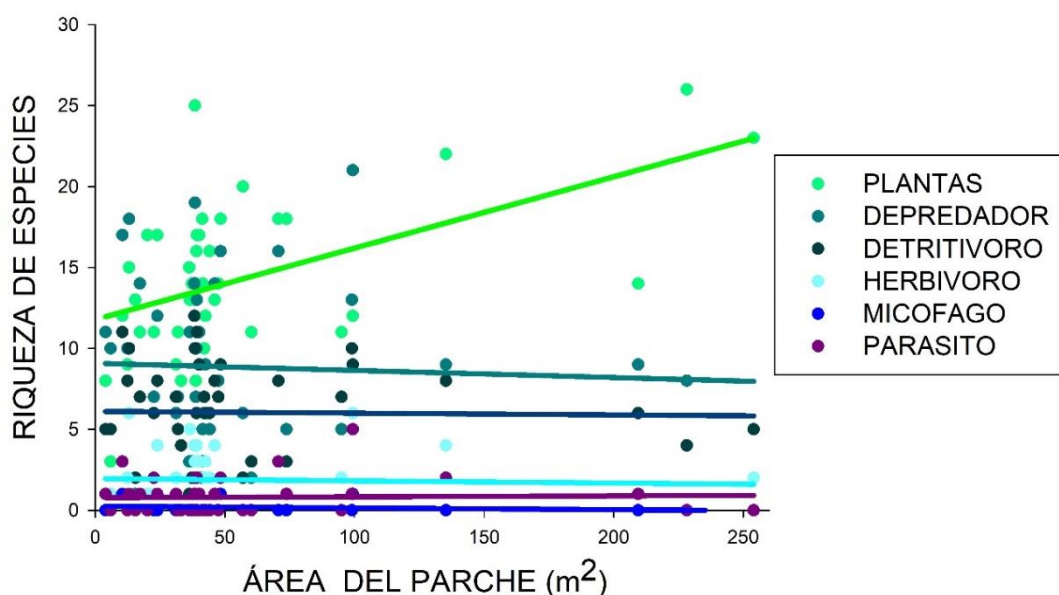


Figura 12. Se muestra la variación de la riqueza de los distintos grupos tróficos en función del área del parche.

Se observó que el tamaño del parche no afectaba de forma significativa a la abundancia de ningún grupo trófico, excepto a las plantas vasculares, en las que el aumento de tamaño fue desfavorable para el número de individuos (Fig. 11, Tabla 2). El estado del parche, por su parte, influyó significativamente en la variabilidad de la abundancia de los herbívoros y micófagos (Tabla 2).

Además, se muestra que el número de especies de la mayoría de los grupos tróficos se mantenía constante con el área, salvo en el caso de las plantas vasculares, en las que la riqueza aumentaba significativamente con el tamaño. En este grupo, vimos que la variabilidad de su riqueza venía determinada en un 25 % por los predictores, es decir, por el estado y el tamaño del parche, siendo éste último el más relevante (Fig. 12, Tabla 3). En el resto de grupos tróficos, por lo general, ninguno de estos dos predictores (área y calidad) afectaron de forma significativa a su riqueza (Tabla 3).

Por tanto, teniendo en cuenta las dos figuras, se encontró que a mayor tamaño del parche, había también mayor número de especies de plantas vasculares, pero éstas presentaban menos individuos.

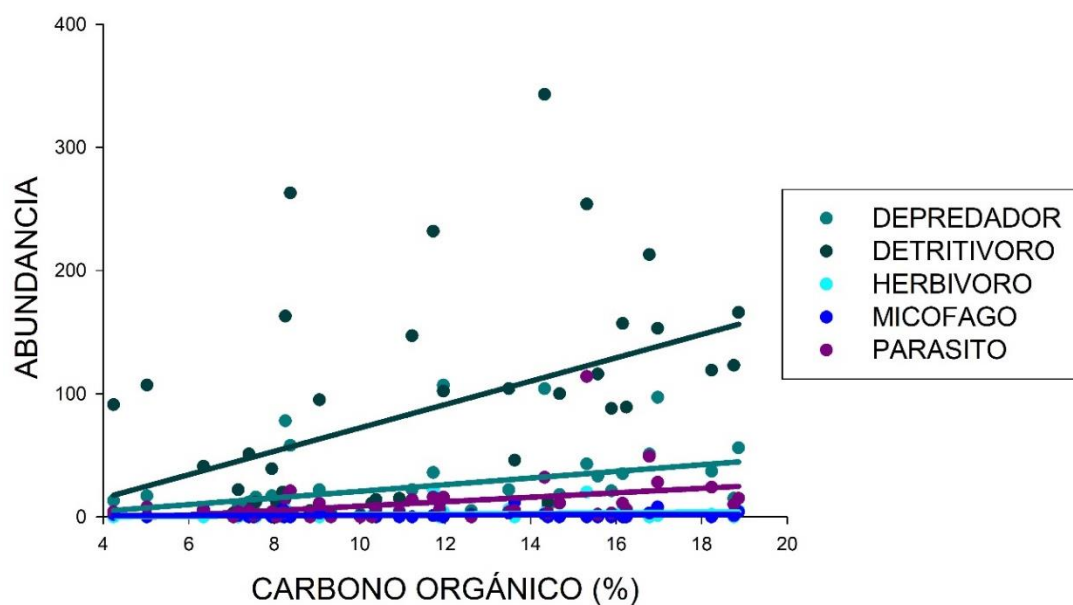


Figura 13. Se muestra la variación de la abundancia de los distintos grupos tróficos en función del porcentaje de carbono orgánico del suelo.

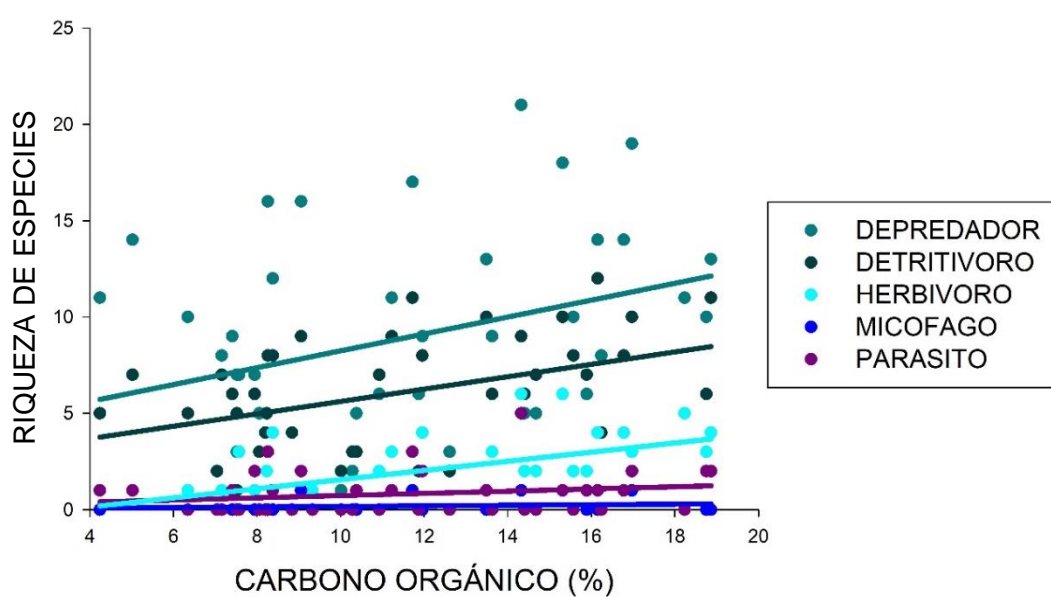


Figura 14. Se muestra la variación del número de especies de los distintos grupos tróficos en función del porcentaje de carbono orgánico del suelo.

El aumento del carbono orgánico del suelo, influyó positiva y significativamente en la abundancia de depredadores, parásitos y detritívoros, aunque estos últimos fueron los que aumentaron con un ritmo más pronunciado (Fig. 13, Tabla 2).

Respecto a la riqueza, ésta aumentó significativamente con el aumento de carbono orgánico en depredadores, detritívoros y herbívoros. Siendo este aumento significativo para los detritívoros y herbívoros, y marginalmente significativo para los depredadores (Fig. 14, Tabla 3). Además, la variabilidad en riqueza de herbívoros se pudo explicar en un 26 % por el carbono orgánico del suelo (Tabla 3).

4.2 Variación de la estructura trófica con la fragmentación y la calidad de hábitat

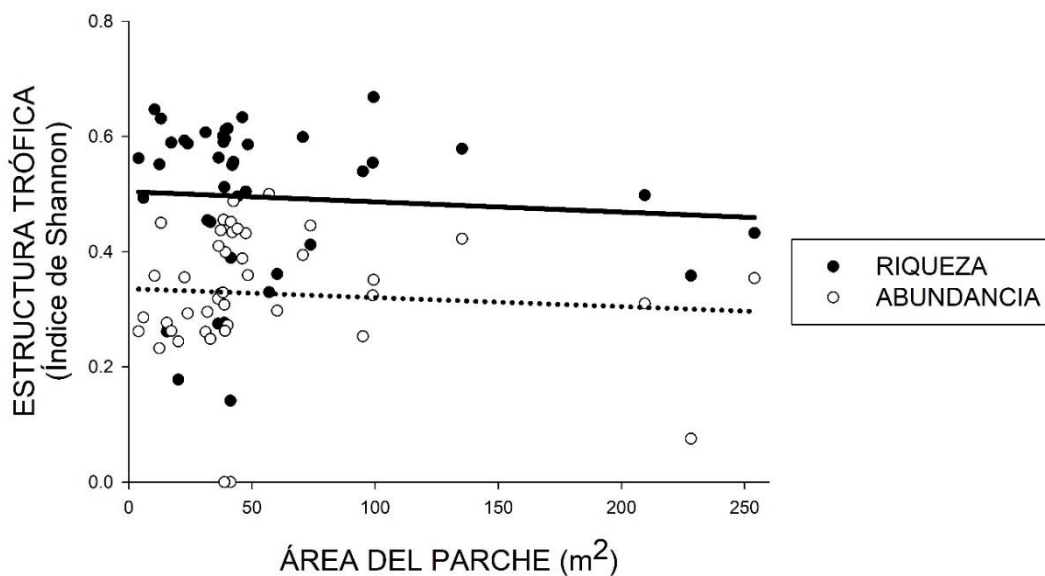


Figura 15. Se muestra la variación de la estructura trófica, medida mediante el Índice de Shannon, en función del área del parche.

En la Figura 15 pudimos apreciar una tendencia en la que la equitatividad para la riqueza fue mayor que para la abundancia, por lo que se encontró más variación en el número de individuos que en el de especies. También vimos que tanto para la riqueza como para la abundancia, la estructura trófica fue más equitativa en parches de área pequeña. Y que desde ahí, dicha equitatividad iba disminuyendo paulatinamente conforme aumentaba el área del parche. Por lo que un aumento en el área implica una tendencia a un mayor número de especies en cada grupo trófico y un número más dispar de individuos que pertenece a cada uno, lo que conlleva a una dominancia de unos grupos tróficos sobre otros (Fig. 15). Pese a que se observaron las tendencias comentadas, éstas no fueron significativas para la abundancia (p -valor = 0.958) ni para la riqueza (p -valor = 0.867).

Estos resultados, unidos a las Figuras 11 y 12, nos mostraron que pese a que se producían cambios en el área y en la equitatividad que implicaban variaciones de cada grupo, el grupo trófico dominante no variaba. En el caso de la abundancia, el grupo dominante para cualquier área fueron los detritívoros, aunque al final se apreciaron mayores diferencias y, por tanto, dominaban con mayor superioridad; mientras que para la riqueza, el grupo que se mantenía fue el de las plantas vasculares, que, como en el caso anterior de los detritívoros, a mayores áreas dominaban con mayor superioridad.

Por otro lado, pese a que el área no determinó de un modo significativo la variación de la estructura trófica, el estado del parche sí influyó significativamente en la equitatividad en la abundancia de los grupos tróficos (p -valor = 0.047). Por lo que, en base a todo lo comentado anteriormente, si hablamos de grupos tróficos por separado, el estado únicamente explicó significativamente la variabilidad de la abundancia de herbívoros y micófagos (Tabla 2). Pero si hablamos de todos ellos en conjunto, vimos que el estado sí afectaba significativamente y podía explicar en cierta medida, la variación de la equitatividad de la abundancia de los parches.

5. DISCUSIÓN

5.1 Los grupos tróficos no responden igual a los mismos cambios ambientales

En el presente estudio, la abundancia estimada de los grupos de fauna del suelo con mayor peso es comparable a lo que se ha observado en otros bosques con condiciones climáticas similares (por ejemplo, los de Francia (Boyd *et al.*, 2013)). En estos sistemas, en cuanto a la mesofauna, también hubo una abundancia mucho mayor de detritívoros (ácaros y colémbolos) que de depredadores, además de coincidir también en que el grupo detritívoro principal fueron los oribátidos. Por otro lado, en el caso de la macrofauna, encontramos que los grupos principales de nuestros resultados, diplópodos y psocópteros, se asocian positivamente con una elevada descomposición de materia orgánica y con altos niveles de defoliación de árboles, respectivamente (Jiménez-Chacón *et al.*, 2018), características que coinciden con las de nuestra zona de estudio. Todo ello nos induce a pensar que nuestros resultados respecto a los grupos dominantes de fauna del suelo son correctos.

Tanto los ácaros como los colémbolos han sido ampliamente estudiados como indicadores ambientales de la calidad del suelo (Gerlach *et al.*, 2013). En concreto, el estudio de Jiménez-Chacón *et al.* (2018) y el de Mueller *et al.* (2016) seleccionaron claramente la disponibilidad de luz como un determinante principal de la fauna del suelo, teniendo ésta un efecto negativo en detritívoros y depredadores. Esto es debido a que un aumento en la disponibilidad de luz implica mayor temperatura del suelo y una disminución de la humedad por evaporación, características que no favorecen a estos grupos de fauna (Cobb y Rizzo, 2016). Pero, la abundancia de la fauna del suelo no está sólo regida por la luz, sino que también influyen otros factores. En ecosistemas con sequías estivales marcadas, como el de nuestro estudio, se ha demostrado que los patrones de biodiversidad del suelo, están fuertemente relacionados con la irregularidad espacial de la distribución de la vegetación (Bardgett, 2005), y que los patrones de biodiversidad de plantas están relacionados con el tamaño de los arbustos individuales (Maestre y Cortina, 2005). De esta forma, los suelos ubicados debajo de plantas presentan una mayor biodiversidad que suelos desnudos expuestos, pues las plantas actúan como islas de recursos para las especies (Herman *et al.* 1995). Además, la heterogeneidad espacial que presentan las zonas donde la vegetación está esparcida, conlleva cambios en la estructura del suelo que se relacionan negativamente con la descomposición y la cantidad de materia orgánica (Bardgett, 2005). Por lo tanto, el hecho de que los grupos dominantes varíen en función del tipo de parche, y haya menor proporción de depredadores y detritívoros (grupos con mayor abundancia y riqueza) en claro que en parche puede deberse al conjunto de todos los factores mencionados. Ya que en zonas de claro la incidencia de luz es elevada y la vegetación se encuentra dispersa, al contrario que en parche, donde tanto depredadores como detritívoros encuentran las características físicas adecuadas para su desarrollo y, por tanto, hay mayor número de especies y de individuos.

Otro de los factores importantes que determinan la abundancia y riqueza de las especies es el área del parche, variable con la que hemos determinado la fragmentación del hábitat. El número de especies que puede albergar un área aumenta con la escala espacial y el esfuerzo de muestreo (Chase *et al.*, 2019). Esto ocurre debido a que las áreas de mayor tamaño son más heterogéneas, lo que proporciona las características y oportunidades ideales para que distintos organismos establezcan nichos y coexistan sin rivalidad (Bardgett, 2005). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio no coinciden con los esperados de la relación especies-área, ya que, en general, el número de individuos y de especies se mantiene constante conforme aumenta el área. Un motivo de ello podría ser que, de acuerdo con Chytrý y Otýpková (2003), nuestra área de muestreo no fue adecuada. Ellos establecen que el área mínima de muestreo en vegetación no debe ser inferior a 50 – 200 m², lo cual es mucho mayor que el área media

utilizada en este estudio, en el que el 75 % de los parches muestreados no superan los 50 m². Además, se ha comprobado que en parches demasiado pequeños la relación especies-área varía debido a efectos locales medioambientales, a la heterogeneidad del hábitat, la estocasticidad y el tamaño de las poblaciones de las especies (Chisholm *et al.*, 2013; Schrader *et al.*, 2019). De este modo, áreas de muestreo demasiado pequeñas pueden inducir a extrapolaciones erróneas de la relación especies-área de una zona. Los datos no esperados en riqueza y abundancia que se han obtenido en este estudio pueden estar causados por el uso de áreas de muestreo demasiado pequeñas.

Por otra parte, en nuestra zona de estudio se vio que el carbono orgánico del suelo variaba y, con él, las especies. Una mayor cantidad de carbono orgánico en el suelo conlleva un gran auge de los detritívoros debido a su tipo de alimentación, pues se ha encontrado una correlación positiva entre la biomasa del recurso y la del consumidor (De Sassi y Tylianakis, 2012). De este modo, tan pronto como la hojarasca se cae de los árboles y se va acumulando la materia orgánica en el suelo, los detritívoros empiezan a alimentarse, fragmentándola (Aerts, 1997). Según nuestros resultados, vemos que aumentan también los depredadores y parásitos con el carbono orgánico del suelo. El aumento de ambos se puede deber al mayor número de presas y huéspedes, pues varios estudios han demostrado que la abundancia de detritívoros y mesofauna depredadora está fuertemente correlacionada (Jiménez-Chacón *et al.*, 2018) y, a su vez, la biomasa de parásitos está correlacionada positivamente con la de depredadores (De Sassi y Tylianakis, 2012). Por lo que una mayor abundancia de los grupos tróficos mencionados, sería fruto de un aumento de detritívoros, que generaría un aumento de los otros dos por las relaciones tróficas que existen entre ellos.

Por último, en cuanto a la riqueza de especies, el aumento del número de especies de algunos grupos tróficos con el carbono orgánico del suelo podría estar relacionado con un aumento en diversificación y en la especificidad de las relaciones tróficas. Como hemos comentado anteriormente, una concentración mayor de carbono orgánico, favorece el desarrollo de los detritívoros e implica una aparición de un mayor número de especies al disminuir la competencia interespecífica por el aumento de recurso (Svanbäck y Bolnick, 2006). Paralelamente, el aumento de especies de plantas vasculares podría estar debido al aumento en la riqueza de detritívoros, debido a que este grupo trófico favorece el crecimiento de las plantas (Aerts, 1999; Bardgett, 2005) o, por el contrario, podrían ser las plantas vasculares las que generaran dicho aumento de carbono orgánico en el suelo debido a la mayor disponibilidad de hábitats (Fornara y Tilman, 2008; Maestre y Cortina, 2005). De todos modos, un aumento en la riqueza de plantas vasculares podría generar un mayor número de especies de herbívoros que

se pueden alimentar de ellas debido a la especificidad y, por ende, también de depredadores. Este último dato, pese a que es lo que cabría esperar, no podemos confirmarlo con seguridad debido a que los estudios que comparan los efectos generales de los cambios en múltiples niveles tróficos son escasos.

5.2 La estructura trófica varía con la calidad de hábitat

Observamos una tendencia, aunque no significativa, de una disminución en la equitatividad en la abundancia y riqueza de la estructura trófica general de la zona con el aumento del área. Estos resultados fueron los esperados, pues estudios como el de Santoja *et al.* (2016) y el de Shearer (2014) han mostrado que los suelos con más área y, por tanto, más biomasa de hojarasca presentan mayor diversidad y abundancia de diferentes grupos de meso y macrofauna al enriquecer el suelo con materia orgánica y nutrientes; y al permitir un mayor número de microhábitats, que aumenta la diferenciación de nichos entre los grupos. Todo ello, unido a que unos grupos tróficos se vieron más favorecidos por el aumento del tamaño del parche que otros, provocaría una disminución de la equitatividad, debido a que los grupos tróficos aumentan de un modo desigual su abundancia. Por otro lado, pese a ver dicha tendencia, se observó que los grupos dominantes en riqueza y abundancia no variaban. Éstos fueron las plantas vasculares para la riqueza y los detritívoros para la abundancia. Para estos últimos, se encontró que el tamaño del árbol, tuvo un efecto positivo en la abundancia de los detritívoros, especialmente en los colémbolos (Mueller *et al.*, 2016). Dado que el área de nuestros parches fue medida en base a la elipse formada por la copa de una encina, este podría ser un motivo por los que encontramos una dominancia de los detritívoros con mayor superioridad conforme aumenta el área, dado que esto implica encinas de mayores tamaños. En el caso de las plantas vasculares, como hemos comentado anteriormente, el aumento de la riqueza puede estar favorecido por la gran abundancia de detritívoros (Aerts, 1999).

Pese a todo ello, nuestros resultados indicaron que la fragmentación del hábitat no afecta significativamente a la estructura trófica. Esto podría deberse, en parte, a que este tipo de estudios son a largo plazo (décadas) y dependientes de la escala (Vellend *et al.* 2006), ya que la fragmentación del hábitat tiene un efecto retardado en el tiempo sobre la pérdida de biodiversidad (Helm *et al.*, 2006) y vemos, por ejemplo, en estudios como el de Cordeiro *et al.* (2009) que fragmentos de bosque en los que no hay reclutamiento de plántulas en el sotobosque aún pueden sobrevivir.

Para acabar, hablaremos de la calidad del parche, medida en este estudio en función de la afección de las encinas a la “seca”. La calidad del parche se trata de un excelente predictor de la abundancia de especies a escalas locales y regionales (Schrader *et al.*, 2019). Nuestros resultados mostraron que, si separamos los grupos tróficos, el estado del parche influye significativamente tan solo en la abundancia de herbívoros y micófagos; pero que si analizamos los grupos de una forma conjunta, la calidad del parche afecta significativamente a la equitatividad de la abundancia de toda la estructura trófica. Para relacionar esto con la “seca”, hemos de conocer un poco más cómo funciona esta patología. En etapas tempranas, *Phytophthora cinnamomi* causa la defoliación de las encinas aumentando la caída de la hojarasca y la materia orgánica del suelo, lo que constituiría un beneficio para algunos grupos tróficos, como los detritívoros, debido a los motivos que hemos comentado anteriormente. Pero, a medida que va avanzando la enfermedad, los árboles deshojados contribuyen menos a los depósitos de materia orgánica y conducen a un aumento en la disponibilidad de luz de la zona. Esto puede elevar la temperatura del suelo y reducir su humedad, lo que sería beneficioso para algunos grupos tróficos y negativo para otros como el que hemos mencionado, los detritívoros (Jiménez-Chacón *et al.*, 2018; Montoya y Meson, 1993). En concreto, se ha demostrado que un aumento en la temperatura y disponibilidad de luz tiene efectos positivos sobre el tamaño de la población de herbívoros (Bale *et al.*, 2002); y que, con la “seca”, los micófagos aumentan en abundancia, lo que podría deberse al aumento de recurso, puesto que el patógeno se trata de un oomiceto del grupo de los pseudohongos, del que se pueden alimentar (Moya, 2016).

Todo ello, por tanto, afecta a la estructura trófica de las comunidades y, directa o indirectamente, a los procesos de los ecosistemas como el ciclo de los nutrientes, la herbivoría y la depredación. Por lo que el balance neto del ecosistema que surge a partir de la combinación de estos efectos, depende de la respuesta relativa de los niveles tróficos individuales (De Sassi y Tylianakis, 2012), pero genera cambios en toda la estructura trófica.

6. CONCLUSIONES

En bosques mediterráneos de encinas, los grupos predominantes en la mesofauna del suelo son los ácaros y colémbolos, ambos detritívoros; mientras que en la macrofauna destacan los

diplópodos y psocópteros, también detritívoros. Todas estas especies y grupos tróficos no responden igual a distintos cambios ambientales. Por un lado, los grupos tróficos dominantes varían entre zonas de claro y parche debido a las diferentes características ambientales de estas dos zonas. De este modo, en el claro encontramos una menor abundancia y diversidad de organismos en el suelo, debido a factores ambientales que generan unas condiciones difíciles para su desarrollo. Algunos de ellos son el aumento en la incidencia lumínica y la composición del propio claro, que se caracteriza por una heterogeneidad espacial con vegetación dispersa que genera pocas islas de recursos para la biota y aportan una cantidad reducida de materia orgánica al suelo.

En cuanto al área del parche, no se encontraron diferencias en los grupos tróficos derivadas del cambio en su tamaño. Estos resultados fueron contrarios a los esperados, debido a que el número de individuos y especies no aumentó con el área y, por tanto, los datos no siguieron la relación positiva entre especies-área que esperábamos. Una posible causa de ello es el uso de áreas de muestreo demasiado pequeñas y en las que actúan factores medioambientales locales que provocan variación en los grupos tróficos y, por tanto, generan datos no extrapolables a zonas más extensas.

Por otro lado, sí se han encontrado diferencias en la respuesta de los grupos tróficos a cambios en la concentración de carbono orgánico del suelo. Los detritívoros es el grupo que mayor auge en abundancia presenta debido al aumento de su recurso alimenticio (materia orgánica del suelo), como también les sucede a los depredadores con el aumento de detritívoros y a los parásitos con el aumento de estos dos huéspedes. Además, encontramos una mayor riqueza de plantas vasculares, que podría deberse al aumento de detritívoros, ya que éstos las favorecen; o a la mayor disponibilidad de hábitats. Este aumento podría provocar, a causa de una especificidad en las relaciones tróficas, un aumento también en las especies de herbívoros y éstos afectar a depredadores de igual manera. Desafortunadamente, no hay muchos estudios de este tipo que hayan analizado los cambios en la estructura trófica en múltiples niveles tróficos a la vez, por lo que para afirmar con seguridad que esto es cierto, debemos esperar a que se realicen más estudios al respecto.

La estructura trófica del hábitat tiende a ser menos equitativa con el aumento de tamaño del parche. Pero los grupos dominantes permanecieron, siendo las plantas vasculares para la riqueza, debido a las características asociadas a áreas mayores que hemos comentado; y los detritívoros para la abundancia, ya que su abundancia está relacionada con el tamaño de la encina. El hecho de que no se obtuvieran resultados significativos podría deberse a que los

efectos de la fragmentación sobre la biodiversidad son retardados y dependientes de la escala, por lo que, para ver si estas tendencias pudieran tener relación con el área, se necesitaría un estudio a largo plazo.

Por último, se comprobó que la estructura trófica sí varía en función de la calidad del parche. Los grupos tróficos por separado no presentaron diferencias entre parches sanos y afectados por la “seca”, excepto los herbívoros, que se ven beneficiados por el aumento de temperatura que provoca la mayor incidencia de la luz; y los micófagos, que podrían ser capaces de alimentarse de *Phytophthora cinnamomi*, el pseudohongo que produce la patología. La “seca”, debido a que presenta características diferentes en estados tempranos y tardíos, afecta de forma diferente a cada grupo trófico en cada momento. Esto influye en la estructura trófica de las comunidades y, por tanto, en varios procesos ecosistémicos como el ciclo de nutrientes o las propias relaciones tróficas, ya que el balance neto del ecosistema surge de la suma de las respuestas de cada nivel trófico.

6.1 CONCLUSION

In mediterranean holm oak forest, the dominant groups in the soil mesofauna are the mites and the collembolans, both detritivores; while in the macrofauna are the diplopods and the psocopters, also detritivores. These species and trophic groups do not respond equally to different environmental changes. On the one hand, the dominant trophic groups vary between patch and open areas because these two zones have different environmental characteristics. In this way, in open areas we find a lower abundance and diversity of soil organisms due to environmental factors that generate difficult conditions for their development. Some of these characteristics are the increase in light incidence and the composition of the open areas, which is characterized by a spatial heterogeneity with dispersed vegetation that generates few islands of resources for biota and provides a reduced amount of organic matter to soil.

Regarding the area of the patch, no differences were found in the trophic groups derived from the change in its size. These results were contrary to our expectations because the number of individuals and species did not increase with the area and, therefore, the data did not follow the positive species-area relationship we expected. A possible cause of this is the use of too small sampling areas in which (uncontrolled) local environmental factors may influence the

abundance and diversity of different trophic groups and, consequently, generate data that can not be extrapolated to more extensive areas.

On the other hand, differences in the response of trophic groups to changes in soil organic carbon concentration have been found. The detritivores is the group with the greatest boom in abundance due to the increase of its food resource (soil organic matter), as it also happens to predators with the increase of detritivores and to parasites with increase of these two hosts. In addition, we found a greater richness of vascular plants, which could be due to increase of detritivores, since they favor them; or a greater availability of habitats. That could cause, considering specificity in the trophic relationships, an increase also in the species of herbivores and these affect predators in the same way. Unfortunately, there are not many studies of this type that have analyzed the changes in the trophic structure at multiple trophic levels at the same time, so to affirm with certainty that this is true, we must wait for further studies to be carried out.

The trophic structure of the habitat tends to be less even with the increase in patch size. But the dominant groups remained, being the vascular plants for richness, due to the characteristics associated to larger areas that we have commented; and the detritivores for abundance, since their abundance is related to the size of the holm oak. That we have not achieved significant results may be due to the effects of fragmentation on biodiversity are delayed and dependent on the scale, so to see if these trends could be related to the area, a long-term study would be needed.

Finally, it was found that the trophic structure does vary depending on the quality of the patch. The trophic groups separately did not differ between healthy and affected patches by "oak die-off", except herbivores, which are benefited by the increase in temperature that causes the highest incidence of light; and the mycophages, that could be able to feed of *Phytophthora cinnamomi*, the pseudofungi that produces the pathology. The "oak die-off", because it presents different characteristics in early and late stages, affects each trophic groups differently at each moment. This influences the trophic structure of the communities and, therefore, several ecosystem processes such as the nutrient cycle or the trophic relationships, since the net ecosystem balance is the addition of the responses of each trophic level.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aerts, R. (1997). Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Oikos*, 79, 439-449.

Aerts, R. (1999). Interspecific competition in natural plant communities: mechanisms, trade-offs and plant-soil feedbacks. *Journal of experimental botany*, 50(330), 29-37.

Bale, J. S., Masters, G. J., Hodkinson, I. D., Awmack, C., Bezemer, T. M., Brown, V. K. *et al.* (2002). Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global change biology*, 8(1), 1-16.

Bañeres, A. B. (2013). *Mosquitos (Diptera: Culicidae) de los parques naturales de la Comunidad Valenciana* (Tesis doctoral, Universitat de València).

Bardgett, R. (2005). *The biology of soil: a community and ecosystem approach*. Oxford University Press.

Boyd, I. L., Freer-Smith, P. H., Gilligan, C. A. y Godfray, H. C. J. (2013). The consequence of tree pests and diseases for ecosystem services. *Science*, 342(6160), 1235-1237.

Bregman, T. P., Lees, A. C., Seddon, N., MacGregor, H. E., Darski, B., Aleixo, A. *et al.* (2015). Species interactions regulate the collapse of biodiversity and ecosystem function in tropical forest fragments. *Ecology*, 96(10), 2692-2704.

Brinck, K., Fischer, R., Groeneveld, J., Lehmann, S., De Paula, M. D., Pütz, S. *et al.* (2017). High resolution analysis of tropical forest fragmentation and its impact on the global carbon cycle. *Nature communications*, 8, 14855.

Cagnolo, L. y Valladares, G. (2011). Fragmentación del hábitat y desensamble de redes tróficas. *Revista Ecosistemas*, 20(2-3).

Cartagena, M. C. y Viñolas, A. (2005). Estudio de los escarabeideos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeoidea) de las sierras de Salinas y Onil (Alicante). *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, 49-60.

Chaplin-Kramer, R., Ramler, I., Sharp, R., Haddad, N. M., Gerber, J. S., West, P. C. *et al.* (2015). Degradation in carbon stocks near tropical forest edges. *Nature communications*, 6, 10158.

Chase, J. M., Gooriah, L., May, F., Ryberg, W. A., Schuler, M., Craven, D. *et al.* (2018). A framework for disentangling ecological mechanisms underlying the island species-area relationship. *BioRxiv*, 410126.

Chisholm, R. A., Muller-Landau, H. C., Abdul Rahman, K., Bebbber, D. P., Bin, Y., Bohlman, S. A. *et al.* (2013). Scale-dependent relationships between tree species richness and ecosystem function in forests. *Journal of Ecology*, 101(5), 1214-1224.

Chytrý, M. y Otýpková, Z. (2003). Plot sizes used for phytosociological sampling of European vegetation. *Journal of Vegetation Science*, 14(4), 563-570.

CICYTEX. (2014) Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón Vegetal. ¿Qué es la seca?. Mérida: *Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura*. [Consultado en Mayo de 2019]. Disponible en <http://iprocor.gobex.es/que-es-la-seca/>

Cobb, R. C. y Rizzo, D. M. (2016). Litter chemistry, community shift, and non-additive effects drive litter decomposition changes following invasion by a generalist pathogen. *Ecosystems*, 19(8), 1478-1490.

Cordeiro, N. J., Ndangalasi, H. J., McEntee, J. P. y Howe, H. F. (2009). Disperser limitation and recruitment of an endemic African tree in a fragmented landscape. *Ecology*, 90(4), 1030-1041.

Crockatt, M. E. y Bebbber, D. P. (2015). Edge effects on moisture reduce wood decomposition rate in a temperate forest. *Global Change Biology*, 21(2), 698-707.

Davidson, E. A., Verchot, L. V., Cattanio, J. H., Ackerman, I. L. y Carvalho, J. E. M. (2000). Effects of soil water content on soil respiration in forests and cattle pastures of eastern Amazonia. *Biogeochemistry*, 48(1), 53-69.

De Sassi, C. y Tylianakis, J. M. (2012). Climate change disproportionately increases herbivore over plant or parasitoid biomass. *PLoS One*, 7(7), 40557.

De Vita, P., Serrano, M. S., Callier, P., García, L. V., Trapero, A. y Sánchez, M. (2010). Germinación de los cuerpos hifales (esporangios) de *Pythium spiculum*, patógeno radical de la encina y el alcornoque.

Effron, D. N., Jiménez, M. P., Defrieri, R. L. y Prause, J. (2006). Relación de la actividad de fosfatasa ácida con especies forestales dominantes y con algunas propiedades del suelo de un bosque argentino. *Información tecnológica*, 17(1), 3-7.

Eivazi, F. y Zakaria, A. (1993). β -Glucosidase activity in soils amended with sewage sludge. *Agriculture, ecosystems & environment*, 43(2), 155-161.

Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 34(1), 487-515.

Fornara, D. A. y Tilman, D. (2008). Plant functional composition influences rates of soil carbon and nitrogen accumulation. *Journal of Ecology*, 96(2).

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). AGP – Agriculture and soil biodiversity. [Consultado en Mayo de 2019]. Disponible en <http://www.fao.org>

Galván, I., Aguilera, E., Atiénzar, F., Barba, E., Blanco, G., Cantó, J. L. *et al.* (2012). Feather mites (Acari: Astigmata) and body condition of their avian hosts: a large correlative study. *Journal of Avian Biology*, 43(3), 273-279.

Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural. (2015). Parcs Naturals de la Comunitat Valenciana – Font Roja. *Parques Naturales*. [Consultado en Abril de 2019]. Disponible en <http://www.parquesnaturales.gva.es>

Gerlach, J., Samways, M. y Pryke, J. (2013). Terrestrial invertebrates as bioindicators: an overview of available taxonomic groups. *Journal of insect conservation*, 17(4), 831-850.

Gil, A. (dir). (2000). *Cartografía temática de las tierras alicantinas*. Instituto Universitario de Geografía, Universidad de Alicante, España, 32-33.

Gonzalez, A., Mouquet, N. y Loreau, M. (2009). Biodiversity as spatial insurance: the effects of habitat fragmentation and dispersal on ecosystem functioning. *Biodiversity, ecosystem functioning and ecosystem services*, 134-146.

Haddad, N. M., Brudvig, L. A., Clobert, J., Davies, K. F., Gonzalez, A., Holt, R. D. *et al.* (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science advances*, 1(2).

Hagen, M., Kissling, W. D., Rasmussen, C., De Aguiar, M. A. M., Brown, L. E., Carstensen, D. W. *et al.* (2012). Biodiversity, species interactions and ecological networks in a fragmented world (Academic Press). *Advances in ecological research*, 46, 89-210.

Helm, A., Hanski, I. y Pärtel, M. (2006). Slow response of plant species richness to habitat loss and fragmentation. *Ecology letters*, 9(1), 72-77.

Herman, R. P., Provencio, K. P., Herrera-Matos, J. y Torrez, R. J. (1995). Resource islands predict the distribution of heterotrophic bacteria in Chihuahuan Desert soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1816-1821.

Hernández-Cuba, O., Pérez-Bañón, C. y Marcos-García, M. A. (2008). Los formicidos (Hymenoptera, Formicidae) del parque natural de la Font Roja. *Iberis*, 9.

Herrera, J. M. (2011). El papel de la matriz en el mantenimiento de la biodiversidad en hábitats fragmentados. De la teoría ecológica al desarrollo de estrategias de conservación. *Revista Ecosistemas*, 20(2-3).

Horta, M. D. C. S. M. (2005). *La disponibilidad de fósforo evaluado por el método de Olsen en suelos ácidos de Portugal: significado agronómico y ambiental* (Tesis doctoral, Universidad de Córdoba).

Jiménez-Chacón, A., Homet, P., Matías, L., Gómez-Aparicio, L. y Godoy, O. (2018). Fine Scale Determinants of Soil Litter Fauna on a Mediterranean Mixed Oak Forest Invaded by the Exotic Soil-Borne Pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Forests*, 9(4), 218.

Laurance, W. F., Nascimento, H. E., Laurance, S. G., Andrade, A. C., Fearnside, P. M., Ribeiro, J. E. *et al.* (2006). Rain forest fragmentation and the proliferation of successional trees. *Ecology*, 87(2), 469-482.

Liu, J., Wilson, M., Hu, G., Liu, J., Wu, J. y Yu, M. (2018). How does habitat fragmentation affect the biodiversity and ecosystem functioning relationship?. *Landscape ecology*, 33(3), 341-352.

Lôbo, D., Leão, T., Melo, F. P., Santos, A. M. y Tabarelli, M. (2011). Forest fragmentation drives Atlantic forest of northeastern Brazil to biotic homogenization. *Diversity and Distributions*, 17(2), 287-296.

Loh, J. y Wackernagel, M. (eds.). 2004. *Informe Planeta Vivo 2004*. WWF, Gland.

Lund, E. D., Christy, C. D. y Drummond, P. E. (1999). Practical applications of soil electrical conductivity mapping. *Precision agriculture*, 99, 771-779.

Maestre, F. T. y Cortina, J. (2005). Remnant shrubs in Mediterranean semi-arid steppes: effects of shrub size, abiotic factors and species identity on understorey richness and occurrence. *Acta Oecologica*, 27(3), 161-169.

Martínez, E., Fuentes, J. P. y Acevedo, E. (2008). Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 8(1), 68-96.

Mazón, M., Rodríguez-Berrío, A. y Bordera, S. (2009). Estudio de la fauna de Ichneumonidae idiobiontes (Hymenoptera) en un ecosistema de montaña mediterránea, I. Subfamilias Pimplinae y xoridinae. *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 33(1-2), 123-137.

McCauley, A., Jones, C. y Jacobsen, J. (2009). Soil pH and organic matter. *Nutrient management module*, 8, 1-12.

Montoya Oliver, J. M. y Meson Garcia, M. (1993). *Mortandad de encinas y alcornoques*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid (España).

Moya, J. (2016). *La seca de la Encina en Andalucía* (Trabajo de final de grado, Universidad de Sevilla).

Mueller, K. E., Eisenhauer, N., Reich, P. B., Hobbie, S. E., Chadwick, O. A., Chorover, J. *et al.* (2016). Light, earthworms, and soil resources as predictors of diversity of 10 soil invertebrate groups across monocultures of 14 tree species. *Soil Biology and Biochemistry*, 92, 184-198.

Oficina de Turismo de Alcoy. Naturaleza, Parque Natural Font Roja. Alcoy: *Alcoy turismo*. [Consultado en Abril de 2019]. Disponible en <http://www.alcoyturismo.com>

Parcs Naturals de la Comunitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural. Alcoy: *Parc Natural de la Font Roja*. [Consultado en Abril de 2019]. Disponible en <http://www.parquesnaturales.gva.es>

Peris-Felipo., J. P., Bañeres, A. B., Arias, E. P. L. y Peydró, R. J. (2010). Novedades en la distribución de *Cerambyx cerdo* L. 1758 (Coleoptera, Cerambycidae) en bosques mediterráneos de la Comunidad Valenciana (España). *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 34(1), 235-239.

Peris-Felipo, F. J., Falcó-Garí, J. V. y Jimenez-Peydro, R. (2011). The diversity of Cerambycidae in the protected Mediterranean landscape of the Natural Park of Carrascal de La Font Roja, Spain. *Bulletin of Insectology*, 64(1), 87-92.

Poisot, T., Mouquet, N. y Gravel, D. (2013). Trophic complementarity drives the biodiversity–ecosystem functioning relationship in food webs. *Ecology letters*, 16(7), 853-861.

Pütz, S., Groeneveld, J., Henle, K., Knogge, C., Martensen, A. C., Metz, M. *et al.* (2014). Long-term carbon loss in fragmented Neotropical forests. *Nature Communications*, 5, 5037.

Ramírez, Á. (2004). *Efectos geográficos, ambientales y biológicos sobre la distribución de las aves forestales ibéricas* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.

Ricarte, A. y Marcos-García, M. Á. (2017). A checklist of the Syrphidae (Diptera) of Spain, Andorra and Gibraltar. *Zootaxa*, 4216(5), 401-440.

Santonja, M., Fernandez, C., Proffit, M., Gers, C., Gauquelin, T., Reiter, I. M. *et al.* (2017). Plant litter mixture partly mitigates the negative effects of extended drought on soil biota and litter decomposition in a Mediterranean oak forest. *Journal of Ecology*, 105(3), 801-815.

Santos, T. y Tellería, J. L. (2006). Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. *Revista Ecosistemas*, 15(2).

Schleuning, M., Farwig, N., Peters, M. K., Bergsdorf, T., Bleher, B., Brandl, R. *et al.* (2011). Forest fragmentation and selective logging have inconsistent effects on multiple animal-mediated ecosystem processes in a tropical forest. *PloS one*, 6(11).

Schrader, J., König, C., Moeljono, S., Pärtel, M. y Kreft, H. (2019). Requirements of plant species are linked to area and determine species pool and richness on small islands. *Journal of Vegetation Science*.

Shearer, B. L. (2014). Time course studies of temperature and soil depth mediated sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology*, 43(3), 235-244.

Staddon, P., Lindo, Z., Crittenden, P. D., Gilbert, F. y Gonzalez, A. (2010). Connectivity, non-random extinction and ecosystem function in experimental metacommunities. *Ecology letters*, 13(5), 543-552.

Sullivan, M. J., Talbot, J., Lewis, S. L., Phillips, O. L., Qie, L., Begne, S. K. *et al.* (2017). Diversity and carbon storage across the tropical forest biome. *Scientific Reports*, 7, 39102.

Svanbäck, R. y Bolnick, D. I. (2006). Intraspecific competition drives increased resource use diversity within a natural population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1611), 839-844.

Tejeda, Á. y Lavado, J. F. (2018). Modelos espaciales predictivos del riesgo de seca en Extremadura. Aplicaciones a escala regional y local en espacios naturales protegidos. *Sistemas de información geográfica y teledetección: aplicaciones en el análisis territorial*, 113.

Terborgh, J., Lopez, L., Nuñez, P., Rao, M., Shahabuddin, G., Orihuela, G. *et al.* (2001). Ecological meltdown in predator-free forest fragments. *Science*, 294(5548), 1923-1926.

Tewksbury, J. J., Levey, D. J., Haddad, N. M., Sargent, S., Orrock, J. L., Weldon, A. *et al.* (2002). Corridors affect plants, animals, and their interactions in fragmented landscapes. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(20), 12923-12926.

Tongway, D. J. y Hindley, N. (2004). *Landscape Function Analysis Manual: Procedures for Monitoring and Assessing Landscapes with Special Reference to Minesites and Rangelands*. Canberra, CSIRO Sustainable Ecosystems.

Velásquez, Y., Gobbi, P., Martínez-Sánchez, A. y Rojo, S. (2015). Contribución al conocimiento de los Calliphoridae y Sarcophagidae sarcosaprófagos presentes en un agrosistema del sureste de la península Iberica. *Ciencia forense*, 193, 206.

Vellend, M., Verheyen, K., Jacquemyn, H., Kolb, A., Van Calster, H., Peterken, G. *et al.* (2006). Extinction debt of forest plants persists for more than a century following habitat fragmentation. *Ecology*, 87(3), 542-548.

Viñolas, A. (2017). Noves dades sobre els Ptinidae (Coleoptera) de la Comunitat Valenciana, península Ibèrica. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, 93-99.

Visor Cartogràfic de la Generalitat. Institut Cartogràfic Valencià. Generalitat Valenciana. *Visor de Cartografia*. [Consultado en Abril de 2019] Disponible en <https://visor.gva.es/visor/>

Wardle, D. A. (2016). Do experiments exploring plant diversity–ecosystem functioning relationships inform how biodiversity loss impacts natural ecosystems?. *Journal of Vegetation Science*, 27(3), 646-653.

Wardle, D. A. y Zackrisson, O. (2005). Effects of species and functional group loss on island ecosystem properties. *Nature*, 435(7043), 806.

8. ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISIS DE SUELO

Los métodos que se llevaron a cabo y que se detallarán a continuación pertenecen a tres familias: de análisis básico, de *stock* y de tasas.

Los métodos de análisis básico son aquellos que miden atributos explicativos que definen el resto de características del parche. Aquí encontramos el pH, la conductividad eléctrica y la textura del suelo.

Por otro lado, los métodos de *stock* resultan fundamentales, ya que aportan información del almacenamiento de los nutrientes en el ecosistema. Dentro de esta familia están los métodos de medida del carbono orgánico y del fósforo disponible, elementos muy importantes por ser esenciales para las plantas y para la mesofauna que vive en el suelo, con los que obtenemos una representación abiótica del ecosistema.

Por último, tenemos los métodos de tasas, donde se mide el funcionamiento del parche a nivel de nutrientes. Esta información se obtiene, generalmente, añadiendo un compuesto A y midiendo cuánto de ese compuesto pasa a B por la actividad de los microorganismos del suelo. Encontramos los métodos de medida de la actividad enzimática de β -glucosidasa y fosfatasa, enzimas medidas en este estudio, que proporcionan datos sobre la actividad biológica del suelo.

A continuación, hablaremos de cada uno de los análisis de suelo que se llevaron a cabo en este trabajo.

a) Tamizar.

Método

Se tamizó el suelo con un tamiz metálico con poros de 2 mm de diámetro.

b) Análisis de la humedad del suelo.

Debido a que antes del inicio de las jornadas de laboratorio, se dejaron secar al aire todas las muestras de suelo recolectadas del campo, éstas presentaban un contenido de humedad bajo y similar. Por este motivo, el análisis no se llevó a cabo con las 192 muestras, sino que se eligieron al azar 30 de ellas.

Se pesaron los envases donde se iban a pesar posteriormente los suelos, flaneras en este caso, para después restar dicho peso a la hora de obtener el peso seco. Se pesaron alrededor de 10 g de suelo por flanera, que corresponde al peso fresco. Estas flaneras con suelo se depositaron durante 48 h en una estufa a 80 °C para así evaporar todo rastro de humedad y obtener el peso seco de cada muestra.

El contenido de agua del suelo se expresa en porcentaje de humedad, y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad gravimétrica} = \frac{(\text{peso fresco} - \text{peso seco})}{\text{peso seco}} * 100$$

c) Cuantificación del contenido en carbono del suelo.

Reactivos

- Dicromato potásico 1 N: Se pesaron 49,04 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (calidad PA) desecados previamente en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Se disolvieron en 500 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados y se enrasó a 1 L en un matraz aforado.
- Sal de Mohr 0,5 N: Se pesaron 196 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Se disolvieron en un vaso de precipitados en 600 ml de agua desionizada y 20 ml de H_2SO_4 concentrado, llevando cuidado con el aumento de temperatura de la reacción. Se agitó la solución con un agitador magnético hasta que se disolvió completamente, y se enrasó a 1 L en un matraz aforado con agua desionizada.
- Solución indicadora de orfenantrolina ferrosa: Se disolvieron 1,485 g de orfenantrolina monohidrato y 0,695 g de $\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua desionizada; y se enrasaron a 100 ml en un matraz aforado.

Método

Se pesaron unos 0,2 g de suelo. Se colocaron en un Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron 10 ml de dicromato potásico con una pipeta de vidrio. Se agitó la mezcla manualmente.

Debajo de una campana de extracción de gases se añadieron de golpe 20 ml de H_2SO_4 concentrado para propiciar la reacción. Se añadieron con cuidado, ya que es una reacción violenta que desprende calor. Y se agitó manualmente hasta que se mezcló bien la solución.

Después de dejarla en reposo 30 minutos, se añadieron 200 ml de agua desionizada. Se agitó bien el Erlenmeyer para homogeneizar el contenido y se dejó enfriar (Fig. 16).



Figura 16. Fotografía en la que se ven algunas de las muestras analizadas debajo de la campana de extracción de gases mientras se dejaban enfriar. Además, señalado con una flecha blanca, encontramos el dispensador calibrado que se usó para añadir los 20 ml de H_2SO_4 concentrado.

A continuación, se añadieron 4 gotas de la solución indicadora, un colorante rojizo. Se valoró la solución con sal de Mohr, que actuó como agente reductor, mediante el uso de una bureta. Se dejó caer sal de Mohr sobre la solución, que la fue tiñendo de color verde (Fig. 17) hasta que

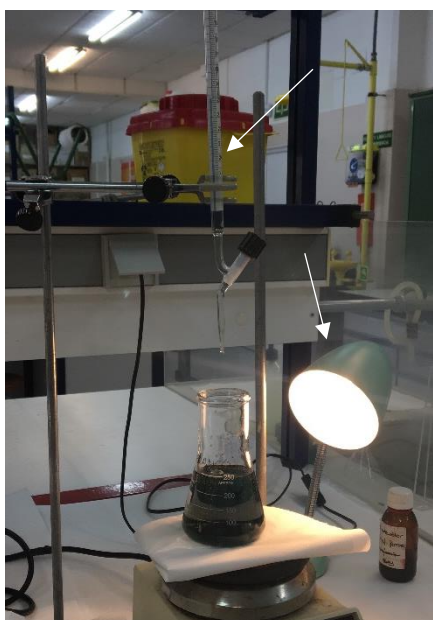


Figura 17. Fotografía en la que se observa el color verdoso que toma la muestra antes del viraje. También se ve la bureta y el flexo que se usó como fuente de luz cercana, señalados ambos con una flecha blanca.

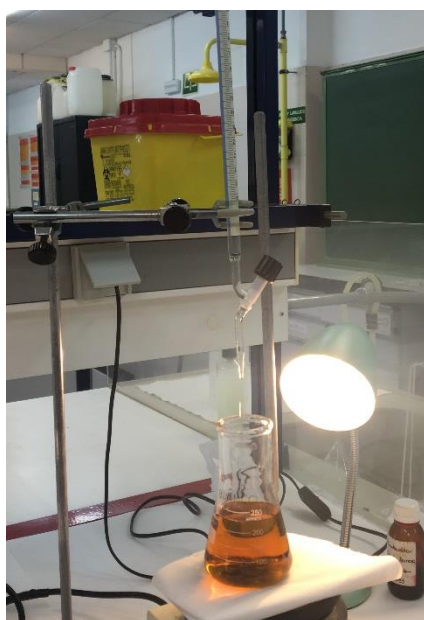


Figura 18. Fotografía en la que se puede ver el color resultante tras el viraje (marrón-rojizo) que pone fin a la valoración.

se produjo un viraje del color verde a marrón-rojizo (Fig. 18). Aquí es cuando finalizó la valoración y se anotaron los ml usados de sal de Mohr para cada muestra. Se usó una fuente de luz cercana como ayuda para la observación del viraje.

Este proceso, además de realizarse con las 192 muestras de suelo, se llevó a cabo con dos soluciones sin muestra de suelo, que fueron el blanco del método. Esto fue necesario para poder calcular la normalidad exacta de la sal de Mohr mediante la siguiente expresión matemática, siendo B los ml usados de sal de Mohr en la valoración para el blanco, y dando por hecho que la normalidad del dicromato es 1:

$$N_{Mohr} = \frac{10 \text{ ml} * N_{Dicromato}}{B}$$

El cálculo de la normalidad exacta es importante, ya que la sal de Mohr no es estable y su normalidad con el tiempo disminuye. Estas variaciones se deben a que el 100% del reactivo no se encuentra en forma de Fe^{2+} , que es la forma reductora; y a que a medida que pasa el tiempo, parte del Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} .

Una vez conocimos la normalidad exacta de la sal de Mohr, calculamos las miliequivalentes de dicromato que gastamos para oxidar el carbono de la muestra a CO_2 . Utilizamos la siguiente fórmula, siendo X los ml de sal de Mohr que se utilizaron para la valoración de las muestras de suelo:

$$meq C = (B - X) * N_{Mohr}$$

Por último, para expresar este dato en porcentaje, se utilizó una fórmula que tiene en cuenta las equivalencias entre los miliequivalentes y los mg de carbono; y el factor de corrección (f). Éste último es necesario, pues se ha comprobado que el procedimiento no oxida todo el carbono de la muestra. Por tanto, sabiendo que $f = 100/77 = 1.30$, la fórmula usada fue:

$$\% \text{ carbono} = (meq C * 0.003) * (100/g \text{ muestra}) * f$$

d) Análisis de la conductividad eléctrica y el pH del suelo.

La conductividad eléctrica (CE) se trata de una estimación indirecta de la salinidad de un suelo mediante la medición de la cantidad de sales presentes en solución. Además, la CE se relaciona estrechamente con la materia orgánica acumulada en el suelo, su capacidad de intercambio catiónico y la retención de agua; propiedades que influyen directamente en la productividad del suelo de forma que a mayor CE, encontramos una menor productividad (Lund *et al.*, 1999).

Por otro lado, medimos el pH porque es una de las principales variables en los suelos, ya que controla muchos procesos químicos y actúa sobre las cualidades del suelo. Entre ellas, el pH tiene gran influencia en la disponibilidad de nutrientes para las plantas, ya que afecta directamente a las formas químicas de los nutrientes. Generalmente, los macronutrientes (N, K, Ca, Mg y S) están más disponibles en un rango de pH entre 6.5 y 8, excepto el P, que se encuentra más disponible con un pH entre 6 y 7; mientras que los micronutrientes (C, Cu, Fe, Mn, Ni y Zn) están más disponibles en un rango entre 5 y 7 (McCauley *et al.*, 2009).

Para medir estas dos variables, se pesaron 10 g de suelo y se diluyeron con 50 ml de agua desionizada en botes de plástico de 100 ml, obteniendo una dilución 1:5. Se agitaron manualmente durante 3 minutos para así recoger en el agua los electrolitos, sales y radicales libres del suelo; y se dejaron reposar otros 3 minutos. Con la ayuda de un embudo y con papel de filtro, se filtró el contenido de los botes. Se obtuvo una disolución acuosa con los iones disueltos en tubos de ensayo de 30 ml.

Finalmente, se usó un conductímetro para la medición de la conductividad eléctrica; y un pH-metro para la medición del pH de cada una de las disoluciones obtenidas.

e) Determinación del fósforo asimilable en suelo – Método de Olsen.

Esta determinación se trata de una variación del protocolo del método de Olsen. En ella, a la muestra de suelo se le añade una solución de bicarbonato de sodio que se encarga de reducir la concentración de los iones calcio, aluminio y hierro (III) por precipitación de carbonato de calcio e hidróxidos de aluminio y hierro (III), liberando así los iones fosfato de la solución. El fósforo asimilable del extracto se determina por colorimetría mediante el azul de molibdeno, usando ácido ascórbico como agente reductor.

Es importante conocer el contenido de fósforo asimilable (fitodisponible) en el suelo debido a que se trata de un macronutriente esencial para las plantas que, por lo general, se encuentra en menores proporciones de forma asimilable que el resto (Horta, 2005). Con ello, se pretende completar la descripción abiótica del suelo que se inició con los métodos anteriormente descritos.

Reactivos

Para la realización de este análisis, sólo se usaron reactivos de grado analítico reconocido y agua de clase 1 ($CE \leq 0,2 \text{ mS/m}$ a 25°C y un $pH > 5,6$).

- Disolución de NaOH 1 M: Se disolvieron 40 g de hidróxido de sodio en agua desionizada y se dejó enfriar. Una vez frío, se diluyó a 1 L con agua desionizada y se guardó en un envase de polietileno herméticamente cerrado.
- Solución de NaHCO_3 0,5 M a pH 8,5: Se disolvieron 42 g de bicarbonato de sodio en agua desionizada y se diluyó a 1 L con el mismo agua. Se ajustó el pH a $8,5 \pm 0,2$, con la disolución de NaOH 1 M. También se guardó en un envase de polietileno. Se tuvo en cuenta la verificación del pH antes del uso de la solución y se reajustó cuando el pH era distinto a 8,5, ya que el pH es importante por su incidencia en la solubilización del P.
- Reactivo combinado: Este reactivo se preparó con tres disoluciones distintas.
 - Disolución de molibdato amónico 0,6 %: Se pesaron 6 g de molibdato amónico y 0,15 g de tartrato de antimonio y potasio, y se diluyeron en 500 ml de agua desionizada. Se añadieron 74 ml de ácido sulfúrico 98 %. Se dejó enfriar y se enrasó a 1 L con agua desionizada.
 - Ácido sulfúrico 0,3 M: En un matraz aforado se añadieron 300 ml de agua desionizada y 16,6 ml de ácido sulfúrico 98 %. Se dejó enfriar la solución y más tarde se enrasó a 1 L.
 - Ácido ascórbico 1,5 %: Se pesaron 1,5 g de ácido ascórbico, se diluyeron en 50 ml de ácido sulfúrico 0,3 M y se enrasó la dilución a 100 ml con este mismo ácido. Dado que esta disolución dura 1 día, se tuvo que preparar cada vez que se necesitó.

Se mezcló un volumen de molibdato amónico 0,6 %, tres volúmenes de agua desionizada y un volumen de ácido ascórbico 1,5 %. Debido a que esta disolución dura 4 horas, también se preparó cada vez que fue necesaria.

- Solución estándar de P, 1000 mg/L de P: Se pesaron 4,39 g de fosfato de dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) secado previamente durante 2 horas a 105 °C. Se diluyeron en un matraz aforado y se enrasó con agua desionizada a 1 L. Una vez preparada se conservó en la nevera.
- Solución estándar de P, 10 mg/L de P: Se diluyó 1 ml de la solución estándar anterior de 1000 ppm con agua desionizada, hasta un volumen de 100 ml.
- Serie de patrones de P: A siete matraces aforados de 100 ml se les agregó diferentes cantidades de la solución estándar de 10 ppm (0 – 1 – 2 – 5 – 10 – 25 – 50 ml) y se enrasaron con bicarbonato de sodio, que actúa de disolución extractora. Por tanto, la serie resultante contenía: 0,0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 2,5 y 5,0 mg/L de P.
- Solución oxidante: Se disolvieron 20 g de persulfato potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) en 500 ml de agua desionizada y se añadieron 3 g de NaOH en lentejas. Se utilizó un agitador magnético

para homogeneizar la solución y se enrasó a 1 L en un matraz aforado con agua desionizada.

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2,25 M.

Método

El método que se detalla a continuación se trata de un método estándar y comparativo, por lo que en todo momento se respetaron los tiempos y las proporciones de los reactivos. Se llevó a cabo con las muestras de suelo, los patrones y dos soluciones blanco sin muestra.

Se pesaron unos 5 g de suelo aproximadamente, anotándose el peso exacto, en botes de plástico de 100 ml y se añadieron 50 ml de NaHCO_3 0,5 M. Se taparon los botes y se agitaron mecánicamente durante 30 minutos. En este periodo, el NaHCO_3 se encarga de reducir la concentración de los iones calcio, aluminio y hierro (III) por precipitación de carbonato cálcico e hidróxidos de aluminio y hierro (III); liberando así los iones fosfato de la solución.

Tras esto, se filtraron las soluciones durante 15 minutos a través de un papel Whatman, que se trata de un papel de filtro libre de P con un tamaño de poro menor a 8 μm de diámetro; y se colocó la solución resultante en tubos de ensayo Pyrex.

A continuación, se llevó a cabo la oxidación de los extractos de suelo. Ésta realizó para la eliminación de la materia orgánica, ya que si es muy abundante, podía interferir en el análisis. Para ello, se añadieron en los tubos Pyrex 5 ml del extracto a oxidar, 0,5 ml de H_2SO_4 2,25 M, y 5 ml de la solución oxidante. Se agitaron bien y se colocaron los tubos tapados en gradillas de metal durante unos 60 minutos a 120 °C en una estufa, hasta que el extracto quedó totalmente incoloro.

Seguidamente, se transfirieron 5 ml de la serie de patrones estándar, blancos y extractos de muestras ya oxidados a un nuevo tubo Pyrex. Se añadieron 25 ml de reactivo combinado para desarrollar el color, se agitaron los tubos suavemente para liberar el dióxido de carbono y se dejaron reposar 1 hora.

Finalmente, el fósforo del extracto se determinó por colorimetría mediante el método del azul de molibdeno, con ácido ascórbico como reductor. Se usó un espectrofotómetro para leer la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 880 nm (Fig. 19).

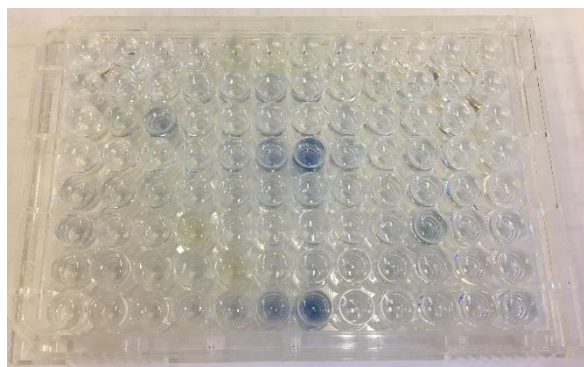


Figura 19. Fotografía de una de las placas en las que se midió la absorbancia a 880 nm. En cada pocillo se encuentran 300 µl de cada muestra.

Tras la realización de una curva de calibrado con las absorbancias obtenidas, se utilizó la siguiente expresión matemática para el cálculo del fósforo (mg/kg suelo):

$$P \text{ (mg/kg suelo)} = (a - b) * \frac{50}{s}$$

Siendo *a* los mg/L de P en las muestras, *b* los mg/L de P en los blancos, *s* el peso seco de la muestra de suelo.

f) Determinación de la textura del suelo.

El objetivo de este test (Tongway y Hindley, 2004) es determinar la textura del suelo superficial de forma manual. La prueba se basa en una clasificación del tipo de suelo en función de su textura. Ésta se obtiene siguiendo un esquema de pasos parte del test. Se lleva a cabo haciendo servir principalmente el tacto.

Esta prueba la realizamos para conocer la composición del suelo (porcentaje de limo, arena y arcilla) y porque la textura está relacionada con la cantidad de agua y aire que es capaz de retener el suelo, y con su velocidad de infiltración.

Dado que el resultado de este procedimiento no varía con las muestras de un mismo lugar, se realizó en un par de muestras al azar.

La prueba se basa en una clasificación, simplificada a 4 clases, del tipo de suelo en función de su textura (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación del suelo en función de su textura.

(Tongway y Hindley, 2004)

Texture	Class
Silty clay to heavy clay (very slow infiltration rate)	1
Sandy clay loam to sandy clay (slow infiltration rate)	2
Sandy loam to silt loam (moderate infiltration rate)	3
Sandy to clayey sand (high infiltration rate)	4

Para llevar a cabo el test, se tomó una muestra de suelo de una profundidad entre 0 y 5 cm con un volumen que permitiera que se ajustara cómodamente a la mano. Se humedeció el suelo con agua, poco a poco, hasta que se alcanzó el “punto pegajoso”, que consiste en la formación de una bola de suelo que no se adhiere a los dedos. Esto ocurre cuando nos aproximamos a la capacidad de campo de ese suelo. Para determinar la textura del suelo, se siguieron unas pautas esquemáticas (Fig. 20) que se basan en el comportamiento de la bola formada al ser presionada entre los dedos pulgar e índice, que tiene en cuenta aspectos como la agregación del suelo, la formación o no de una cinta, cómo de áspera o suave es la muestra y su sonido al ser frotada.

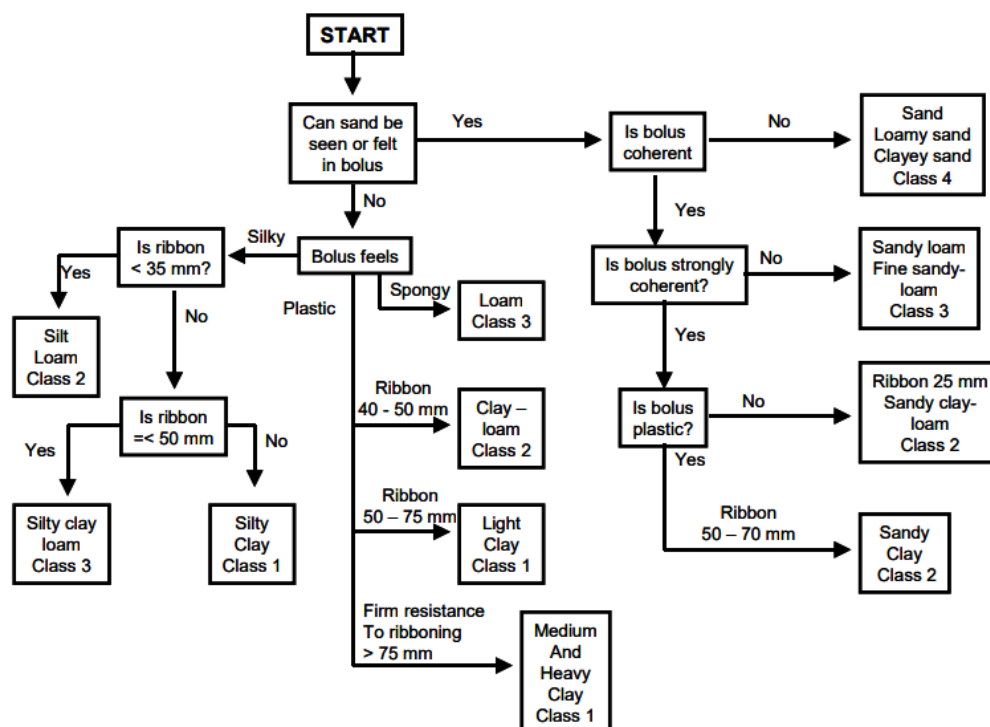


Figura 20. Esquema del proceso de la determinación manual de la textura del suelo (Tongway y Hindley, 2004).

g) Análisis de la actividad de la enzima β -glucosidasa en el suelo.

Este análisis se realizó debido a la relevancia que presenta la concentración de la enzima β -glucosidasa en el suelo, ya que interviene en el ciclo del carbono hidrolizando los enlaces β -glucosídicos de las cadenas de hidratos de carbono y, por tanto, interviene en la descomposición de la materia orgánica. Por ello, juega un papel importante en la obtención de energía para los microorganismos del suelo (Eivazi y Zakariah, 1993). Además, es otro tipo de método para la cuantificación de carbono orgánico del suelo.

El método utilizado toma como referencia el estudio de Tabatabai (1982). Se basa en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol obtenido por la acción de la β -glucosidasa tras incubar el suelo con el sustrato β -D-glucopiranosido.

Reactivos

La cantidad de los componentes de los siguientes reactivos son las que aparecen en el protocolo original, pero a la hora de realizar el análisis, se modificaron estas cantidades en función de lo necesitado, respetando en todo momento la proporción original de los componentes de cada reactivo.

Además, debido a que cada reactivo tiene una vida útil diferente, se marcó en cada envase el día de preparación de cada uno de ellos para tenerlo en cuenta.

- I. Solución stock: Se pesaron 12,2 g de THAM (trishidroximetilaminometano), 11,6 g de ácido maleico, 14 g de ácido cítrico y 6,28 g de ácido bórico. Se añadieron 488 ml de NaOH 1M (reactivo V) y se disolvió todo el conjunto con agua, enrasándose la disolución a 1 L en un matraz aforado. Puesto que este reactivo se puede conservar hasta 6 semanas en la nevera, no hubo problemas en su uso durante todos los días de análisis.
- II. Tampón MUB (buffer universal modificado) (pH 6,5): Se tomaron 200 ml de la solución stock (reactivo I) y con agua desionizada se llevó hasta casi 1 L. Se ajustó el pH a 6,5 usando HCl 1:1 (reactivo VII) y se enrasó a 1 L con agua desionizada en un matraz aforado.
- III. Solución sustrato (p-nitrofenil β -D-glucopiranosido 25 mM): Se disolvieron 0,377 g de p-nitrofenil β -D-glucopiranosido en 50 ml de tampón MUB (reactivo II). Dado que esta disolución dura 1 día, se tuvo que preparar cada vez que se necesitó.

- IV. CaCl_2 0,5 M: Este reactivo ya venía preparado. Únicamente se tuvo en cuenta para posteriores cálculos que la sal que se usó fue cloruro de calcio con 2 moléculas de agua.
- V. NaOH 1 M: Se pesaron 40 g de NaOH, el equivalente a 1 mol, y se disolvió en 1 L de agua desionizada. En este caso, el NaOH no vino como molécula hidratada.
- VI. NaOH 0.5 M: Se disolvieron 20 g de NaOH en 1 L de agua desionizada.
- VII. HCl 1:1.: Para ello, se mezcló el mismo volumen de agua desionizada que de HCl puro (35%). Se llevó mucho cuidado en mezclar el HCl en el agua y no al revés, ya que en el caso contrario, la disolución desprende un gas tóxico de cloro.
- VIII. Solución extractante (THAM pH 12): Se pesaron 12,2 g de THAM y se llevó a casi 1 L con agua desionizada. Se ajustó el pH a 12 con NaOH 0.5 M (reactivo VI) y, con agua desionizada se enrasó a 1 L en un matraz aforado.

Método

El método que se detalla a continuación se llevó a cabo en todas las muestras de suelo. Para cada una, se necesitaron dos tubos. Uno donde se añadió el sustrato para la enzima antes de la incubación (Muestra A); y otro que hizo de control, en el que el sustrato se añadió después de la incubación (Muestra B). Por lo que en este método se manejaron Muestras A, B y patrones que, debido a la diferencias en el tratamiento de cada tipo de muestra, se habla de cada una por separado.

Antes de empezar con el protocolo, se prepararon los patrones con concentraciones de 0, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 500 y 650 mg/L de p-nitrofenol a partir de una disolución madre de 1000 mg/L. Para ésta, se pesó 1 g de p-nitrofenol y se diluyó con agua desionizada hasta enrasar a 1L en un matraz aforado. Estos patrones se prepararon cada día, para que las curvas de calibrado fueran más exactas.

Una vez tuvimos la serie de patrones, añadimos 0,5 ml de cada patrón a tubos de 10 ml diferentes. Después, a cada tubo le sumamos 2 ml de tampón MUB, 0,5 ml de CaCl_2 0,5 M, 2 ml de solución extractante y 5 ml de agua desionizada; y se agitaron mediante un agitador vórtex (Fig. 21).

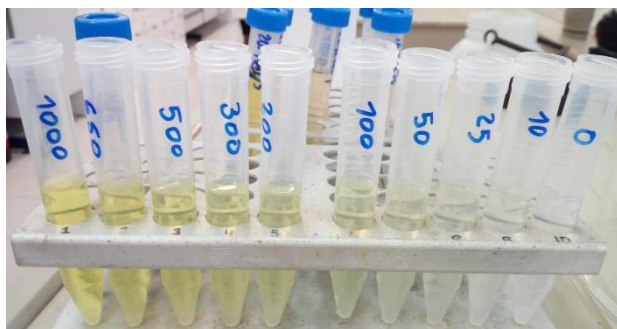


Figura 21. Fotografía de los tubos de los patrones obtenidos ordenados de mayor a menor concentración de p-nitrofenol.

Para las Muestras A, se pesaron 0,5 g de suelo en tubos de 10 ml, a los que se le añadieron 2 ml de disolución tampón MUB (pH 6,5) y 0,5 ml de la solución sustrato. Se agitaron bien la solución con el vórtex y se incubaron las muestras durante 1 hora a 37 °C en un baño caliente. Tras esto, se introdujeron en la nevera 15 minutos. Una vez pasado este tiempo, se añadieron 0,5 ml de CaCl_2 0,5 M, 2 ml de la solución extractante y 5 ml de agua desionizada. Se taparon los tubos y se agitaron dos veces para mezclar perfectamente el contenido, una a mano y otra con el vórtex.

Para las Muestras B, se siguieron los mismos pasos que para las Muestras A, salvo la adición de la solución sustrato, que se realizó tras la incubación.

El siguiente paso fue centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos todas las muestras (Muestras A, Muestras B y patrones) para, finalmente, medir la absorbancia de cada una de ellas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 440 nm, (Fig. 22). El resultado variará en función de la cantidad de p-nitrofenol liberado.



Figura 22. Fotografía de una de las placas en las que se midió la absorbancia a 440 nm. En cada pocillo se encuentran 300 μl de cada muestra.

Tras la realización de una curva de calibrado con las absorbancias obtenidas, se calculó la actividad neta mediante la resta de la actividad de las Muestras B a la de las Muestras A. Por

último, la actividad enzimática de cada muestra, en $\mu\text{moles de p-nitrofenol} * \text{g suelo seco}^{-1} * \text{hora}^{-1}$, se obtuvo como:

$$\mu\text{moles de p-nitrofenol} * \text{g suelo seco}^{-1} * \text{hora}^{-1} = (M/P) * (1/\text{hora}) * f1$$

Donde M son los mg/L de p-nitrofenol en el extracto según la recta de calibrado, P son los gramos de suelo y $f1$ es $1 \mu\text{mol}/139 \mu\text{g p-nitrofenol}$.

h) Análisis de la actividad de la enzima fosfatasa ácida en el suelo.

Por último, se realizó este análisis debido a que la enzima hidrolasa fosfatasa ácida trabaja en la transformación de fósforo orgánico a inorgánico, haciéndolo asimilable para las plantas y participando así en la descomposición de la materia orgánica. Por ello, conocer su actividad y concentración en el suelo resulta fundamental por la información que aporta sobre la cantidad y diversidad de microorganismos que viven en él (Effron *et al.*, 2006).

El método se basa en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol mediante una colorimetría. El p-nitrofenol es liberado de las muestras de suelo por la acción de la fosfatasa tras incubar esas muestras con p-nitrofenilfosfato.

El protocolo y los reactivos son muy similares a los usados en análisis anterior, tan solo varía el reactivo III y el reactivo VIII, que aquí no está presente.

Reactivos

La cantidad de los componentes de los siguientes reactivos son las que aparecen en el protocolo original, pero a la hora de realizar el análisis, se modificaron estas cantidades en función de lo necesitado, respetando en todo momento la proporción original de los componentes de cada reactivo.

Además, debido a que cada reactivo tiene una vida útil diferente, se marcó en cada envase el día de preparación de cada uno de ellos para tenerlo en cuenta.

- I. Solución stock: Se pesaron 12,2 g de THAM (trishidroximetilaminometano), 11,6 g de ácido maleico, 14 g de ácido cítrico y 6,28 g de ácido bórico. Se añadieron 488 ml de NaOH 1M (reactivo V) y se disolvió todo el conjunto con agua, enrasándose la disolución a 1 L en un matraz aforado. Puesto que este reactivo se puede conservar hasta 6 semanas en la nevera, no hubo problemas en su uso durante todos los días de análisis.

- II. Tampón MUB (buffer universal modificado) (pH 6,5): Se tomaron 200 ml de la solución stock (reactivo I) y con agua desionizada se llevó hasta casi 1 L. Se ajustó el pH a 6,5 usando HCl 1:1 (reactivo VII) y se enrasó a 1 L con agua desionizada en un matraz aforado.
- III. Solución sustrato (p-nitrofenilfosfato 25 mM): Se disolvieron 0,4638 g de p-nitrofenilfosfato en 50 ml de tampón MUB (reactivo II). Dado que esta disolución dura 1 día, se tuvo que preparar cada vez que se necesitó.
- IV. CaCl_2 0,5 M: Este reactivo ya venía preparado. Únicamente se tuvo en cuenta para posteriores cálculos que la sal que se usó fue cloruro de calcio con 2 moléculas de agua.
- V. NaOH 1 M: Se pesaron 40 g de NaOH, el equivalente a 1 mol, y se disolvió en 1 L de agua desionizada. En este caso, el NaOH no vino como molécula hidratada.
- VI. NaOH 0,5 M: Se disolvieron 20 g de NaOH en 1 L de agua desionizada.
- VII. HCl 1:1.: Para ello, se mezcló el mismo volumen de agua desionizada que de HCl puro (35%). Se llevó mucho cuidado en mezclar el HCl en el agua y no al revés, ya que en el caso contrario, la disolución desprende un gas tóxico de cloro.

Método

El método que se detalla a continuación se llevó a cabo en todas las muestras de suelo. Para cada una, se necesitaron dos tubos. Uno donde se añadió el sustrato para la enzima antes de la incubación (Muestra A); y otro que hizo de control, en el que el sustrato se añadió después de la incubación (Muestra B). Por lo que en este método se manejaron Muestras A, B y patrones que, debido a la diferencias en el tratamiento de cada tipo de muestra, se habla de cada una por separado.

Antes de empezar con el protocolo, se prepararon los patrones con concentraciones de 0, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 500 y 650 mg/L de p-nitrofenol a partir de una disolución madre de 1000 mg/L. Para ésta, se pesó 1 g de p-nitrofenol y se diluyó con agua desionizada hasta enrasar a 1L en un matraz aforado. Estos patrones se prepararon cada día, para que las curvas de calibrado fueran más exactas.

Una vez tuvimos la serie de patrones, añadimos 0.5 ml de cada patrón a tubos de 10 ml diferentes. Después, a cada tubo le sumamos 2 ml de tampón MUB, 0.5 ml de CaCl_2 0,5 M, 2 ml de NaOH 0,5 M y 5 ml de agua desionizada; y se agitaron mediante un agitador vórtex.

Para las Muestras A, se pesaron 0,5 g de suelo en tubos de 10 ml, a los que se le añadieron 2 ml de disolución tampón MUB (pH 6,5) y 0,5 ml de la solución sustrato. Se agitaron bien la

solución con el vórtex y se incubaron las muestras durante 1 hora a 37 °C en un baño caliente. Tras esto, se introdujeron en la nevera 15 minutos. Una vez pasado este tiempo, se añadieron 0,5 ml de CaCl₂ 0,5 M, 2 ml de NaOH 0,5 M y 5 ml de agua desionizada. Se taparon los tubos y se agitaron dos veces para mezclar perfectamente el contenido, una a mano y otra con el vórtex.

Para las Muestras B, se siguieron los mismos pasos que para las Muestras A, salvo la adición de la solución sustrato, que se realizó tras la incubación.

El siguiente paso fue centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos todas las muestras (Muestras A, Muestras B y patrones) para, finalmente, medir la absorbancia de cada una de ellas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm, (Fig. 23). El resultado variará en función de la cantidad de p-nitrofenol liberado.



Figura 23. Fotografía de una de las placas en las que se midió la absorbancia a 400 nm. En cada pocillo se encuentran 300 µl de cada muestra.

Tras la realización de una curva de calibrado con las absorbancias obtenidas, se calculó la actividad neta mediante la resta de la actividad de las Muestras B a la de las Muestras A. Por último, la actividad enzimática de cada muestra, en µmoles de p-nitrofenol * g suelo seco⁻¹ * hora⁻¹, se obtuvo como:

$$\mu\text{moles de } p - \text{nitrofenol} * g \text{ suelo seco}^{-1} * \text{hora}^{-1} = (M/P) * (1/\text{hora}) * f1$$

Donde *M* son los mg/L de p-nitrofenol en el extracto según la recta de calibrado, *P* son los gramos de suelo y *f1* es 1 µmol/139 µg p-nitrofenol.